



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

**TRANSLOCACIÓN DEL CENTRO ORGANIZADOR
DE MICROTÚBULOS COMO REGULADOR DE LA
SINAPSIS INMUNE Y LA ACTIVACIÓN DEL
LINFOCITO T**

JAVIER ROBLES VALERO

MADRID, 2010



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

TESIS DOCTORAL

TRANSLOCACIÓN DEL CENTRO ORGANIZADOR DE MICROTÚBULOS COMO REGULADOR DE LA SINAPSIS INMUNE Y LA ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T

Memoria presentada por el Licenciado en Bioquímica:

Javier Robles Valero

para optar al título de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid

Lugar de realización: **Servicio de Inmunología,
Hospital Universitario de la Princesa,**

bajo la dirección del **Dr. Francisco Sánchez-Madrid,**
Catedrático de Inmunología de la Universidad Autónoma de Madrid.

AGRADECIMIENTOS

Echando la vista atrás es difícil imaginar que uno pudiera llegar a este momento. Cuando estaba en 4º de la ESO en mi colegio de Talavera y le dije a mi profesor de Ciencias, Leo (gracias), que quería hacer Biología, nada de lo que ha acontecido después era imaginable en aquellos momentos; sin embargo, más de 10 años después, ese sueño que en aquel instante ni flotaba por mi mente está a punto de producirse.

En primer lugar, mi más sincero agradecimiento a Paco por haberme dado la oportunidad de realizar la tesis en su laboratorio y por su esfuerzo y dedicación a lo largo de estos años que ha servido para llevar a cabo numerosos proyectos, además de ese optimismo que derrocha, imprescindible en este mundo. También dar las gracias a Noa, por su tiempo y dedicación, y por ser la persona con la que más estrechamente he colaborado.

Por otro lado, agradecer a todos los componentes del grupo de Paco, sobretodo a los integrantes del Hospital de La Princesa: Mónica G, Ángeles Ursa, Carmen, Hortensia, Ana, Isabel, Mymo, Román y Manolo, que han sabido compartir conmigo el día a día de esta experiencia; y sin olvidarme de los componentes del grupo en el CNIC: Fran, Olga, Pilar, Cris, María, Sales, Norman, Almudena, Marta, Mónica S (y nuestro atleti), Emilio, Juan, y quizá más que me estoy dejando en el tintero. Además no puedo olvidarme de los “Moles” y demás componentes del Servicio de Inmunología. Muchas gracias a todos ellos.

Mención a parte merecen otras personas que han hecho que esta tesis llegue a buen puerto; como no acordarme de Marta, mi compañera de fatigas en el gym, zamorana como ninguna, como se te echa de menos desde que te fuiste; de Esteban, como amigo y como persona, que me ayudó sin pedir nada a cambio, un ejemplo del investigador que uno pretende ser en un futuro no muy lejano; de Manu, con él que tantas veces he reído y compartido numerosas anécdotas; de Fernandito, el “belga” más ilustre; de Susana y Andrea, las nuevas adquisiciones de Pacos3, con los cuales he compartido estos últimos meses; de Anita, que aunque estuvo poco en el hospital contribuyó con su alegría a hacer más llevaderos los momentos difíciles; y de Elena y Rubén, los “niños” del laboratorio que, a pesar de ser los últimos en llegar, con su ímpetu han hecho llevaderos muchos momentos.

Y que decir de Amalia y Arantxa, os debo mucho, sin vosotras dos esta tesis no hubiera sido posible, ya que tanto en los buenos como en los malos momentos habéis estado ahí, apoyándome, y vuestra sincera amistad ha alegrado cada día que hemos pasado juntos en el laboratorio. Al final lo hemos conseguido. Gracias. Y Cristina y su *bambino*, que apareció de repente hace un año en el laboratorio y revolucionó todo aquello que se le ponía por delante. Has conseguido que no deje de reírme en este último año y tu compañía ha sido lo suficientemente grata y sincera, manteniéndome despierto en cada momento. Gracias. Y Giulia, sabes que no tengo palabras para ti, ni tengo el suficiente espacio para darte las gracias ni el tiempo necesario para agradecerte todo lo que has hecho por mí durante estos años. Apareciste de repente de Italia y con tu sonrisa, comprensión, humildad, amistad, y sobretodo, el hecho de saber que siempre estabas ahí, has hecho que esta andadura difícil se me haya hecho un poco más llevadera. Gracias.

Agradecido también a aquellos que sin saber nada de lo que significaba esto han estado ahí; mis amigos Rober, Koke, Pablo, Richi, Toni, Rubén, Andrés, Berna y en especial a Dani y Jose, siempre interesados en aquello que hacía y animándome constantemente. Gracias por vuestro apoyo y comprensión.

Y por último, agradecido a mi familia, que sin ellos no hubiera llegado a donde me encuentro ahora mismo. Tanto a los Robles como a los Valero. Gracias a mis abuelos que siempre están pendientes de que me vaya todo bien. Gracias a mi hermano Víctor, que ha compartido la mayoría del tiempo de tesis conviviendo conmigo y aguantándome. Gracias a mi hermanito Miguel, al cual quiero con locura, y afortunado soy de tenerlo como hermano. Y gracias a Papa y Mama, mis padres; son ellos los artífices de lo que soy hoy; un ejemplo de padres, que se han desvivido por dar a sus hijos de todo, me siento muy orgulloso de vosotros, no tengo palabras para agradecerlos todo lo que habéis hecho y hacéis por mí. Muchas gracias.

RESUMEN

Durante la presentación antigénica, en la célula T se produce una reorganización de receptores de membrana específicos en la zona de contacto con la célula presentadora de antígeno (APC), formando una estructura altamente especializada denominada sinapsis inmune (SI). Para la formación de esta macroestructura es necesaria una gran remodelación del citoesqueleto de la célula, en la que destaca la translocación del centro organizador de microtúbulos (MTOC), al que acompaña el aparato secretor (aparato de Golgi). De este modo, el sistema secretor de la célula T queda orientado hacia la zona de contacto con la APC, favoreciendo así la comunicación célula-célula.

Sin embargo, los mecanismos moleculares que controlan el movimiento del MTOC y cómo este desplazamiento pueda influir en la arquitectura de la sinapsis inmune y la activación del linfocito son poco conocidos. En este estudio se ha analizado el papel del complejo motor dineína/dinactina asociado a microtúbulos en la activación del linfocito T durante la interacción T-APC. La pérdida de actividad del complejo dineína/dinactina, bien mediante la sobreexpresión de la subunidad p50-dinamitina, bien por el silenciamiento de la cadena pesada de dineína (DHC), inhibe la translocación del MTOC tras la estimulación del TCR. Este efecto se traduce en una reducción considerable en la fosforilación de distintas moléculas de señalización tales como ZAP70, LAT y VAV1, así como en la desorganización de la SI, que no es funcional. En estas condiciones, el linfocito T no se activa correctamente y la producción de IL-2 disminuye drásticamente.

Por otro lado, se ha estudiado el papel que desempeña la proteína adaptadora AKAP450, presente tanto en el MTOC como en el aparato de Golgi, en la organización de la SI y la activación del linfocito T. La supresión de la función de AKAP450, ya sea mediante la sobreexpresión de una forma dominante negativa o por el silenciamiento de la proteína endógena provoca la desorganización de la integrina LFA-1 en la SI. Como consecuencia se detecta una menor fosforilación de proteínas activadoras como PLC γ 1 y PKC θ . Además, la función de AKAP450 es necesaria para la correcta activación y fosforilación de CD3, LAT y VAV1, moléculas esenciales en la activación del linfocito T de forma dependiente del TCR. Por último, cuando se interfiere la función de AKAP450 en células T, tanto la reorientación del MTOC como la consiguiente secreción de IL-2 son afectadas.

En resumen, estos datos revelan que la translocación del MTOC, y la maquinaria tanto señalizadora como secretora que lleva asociada, es un mecanismo importante en la formación de la SI y la activación del linfocito T.

SUMMARY

During antigen recognition by T cells, membrane receptors reorganize at the T cell - antigen-presenting cell (APC) junction form a specialized structure called immune synapse (IS). The formation of the IS is associated with a substantial remodeling of the T cell cytoskeleton where the translocation of the microtubule-organizing center (MTOC) and the associated Golgi apparatus toward the nascent IS is an early step in lymphocyte activation, providing the basis for polarized secretion of various molecules by the T cell, thus favoring controlled communication with the APC.

However, the molecular mechanisms that control the physical movement of the lymphocyte MTOC and how this repositioning may influence surface receptor organization at the IS architecture and T cell activation are additional important issues that deserve in-depth studies. The present work has studied the role of the dynein/dynactin complex, a microtubule-based molecular motor, in the process of T cell activation during T cell - APC cognate immune interactions. Impairment of dynein/dynactin complex activity, either by overexpressing the p50-dynamitin component of dynactin to disrupt the complex or by knocking down dynein heavy chain expression to prevent its formation, inhibited MTOC translocation after TCR antigen priming. This resulted in a strong reduction in the phosphorylation of molecules such as ZAP70, LAT and Vav1, resulting in a disorganized and dysfunctional IS architecture, and impaired interleukin-2 (IL-2) production.

On the other hand, we have investigated the role of AKAP450 in IS organization and T cell activation in antigen- and superantigen-dependent T cell activation. Suppression of AKAP450 function by overexpression of a dominant-negative form or siRNA knockdown disrupted the positioning and conformational activation of the LFA-1 integrin at the IS and impaired associated signaling events, including phosphorylation of PLC γ 1 and PKC θ . AKAP450 was also required for correct activation and phosphorylation of CD3, LAT and Vav1, key TCR-activated intracellular signaling molecules. Consistently, antigen-triggered reorientation of the MTOC at the IS and IL-2 secretion were diminished in AKAP450-disrupted T cells.

In summary, these data reveal MTOC translocation, and its associated signaling and secretory machinery, as an important mechanism underlying IS formation and sustained T cell signaling.

ÍNDICE

RESUMEN	3
SUMMARY	7
ABREVIATURAS	16
INTRODUCCIÓN	
1. Respuesta inmune: presentación antigénica y activación del linfocito T	21
1.1. Fases de la interacción célula T-APC	21
1.2. Estructura de la sinapsis inmune	23
1.3. Función de la sinapsis inmune en la activación del linfocito T	24
2. El citoesqueleto celular durante la activación del linfocito T	26
2.1. Polarización del citoesqueleto durante la activación del linfocito T	26
2.2. Papel del citoesqueleto en la formación de la sinapsis inmune y la activación del linfocito T	26
2.3. Citoesqueleto de actina	27
2.4. Citoesqueleto de tubulina	29
A) El centrosoma o centro organizador de microtúbulos (MTOC): estructura y función	29
B) Regulación de la polarización del MTOC durante la activación del linfocito T	31
3. El complejo motor dineína/dinactina asociado a microtúbulos	33
3.1. Dineína: caracterización y estructura	33
3.2. Dineína en la célula: función	34
4. La proteína adaptadora AKAP450	35
4.1. AKAPs: estructura y función	35
4.2. AKAPs y centrosoma	36
4.3. AKAP450	36
A) Caracterización y función	36
B) AKAP450: conexión MTOC / aparato de Golgi	38
OBJETIVOS	43

MATERIALES Y MÉTODOS	47
RESULTADOS	
1. Papel del complejo motor dineína/dinactina en la translocación del MTOC y la activación del linfocito T	57
1.1. Los distintos componentes del complejo dineína/dinactina localizan en la zona de contacto T-APC	57
1.2. La inhibición de la actividad del complejo dineína/dinactina impide la correcta translocación del MTOC a la sinapsis inmune	58
1.3. La depleción de dineína previene la translocación del MTOC	60
1.4. La sobreexpresión de p50-dinamitina-GFP altera la organización de la sinapsis inmune	61
1.5. La señalización intracelular desencadenada tras activación del TCR se encuentra alterada tras la inhibición de la actividad del complejo dineína/dinactina	62
1.6. La inhibición de la translocación del MTOC impide la llegada a la SI de compartimentos intracelulares donde se acumulan moléculas señalizadoras	63
1.7. La producción de IL-2 se inhibe por la sobreexpresión de p50-dinamitina-GFP y el silenciamiento de dineína	64
2. Papel de la proteína adaptadora AKAP450 en la organización de la sinapsis inmune y la activación del linfocito T	66
2.1. La proteína AKAP450 y la organización del p-SMAC en la sinapsis inmune	66
2.2. Papel de AKAP450 en la activación de la integrina LFA-1 en la sinapsis inmune	69
2.3. La supresión de la función de AKAP450 afecta a diferentes eventos de señalización relacionados con la activación de LFA-1	71
2.4. El dominante negativo de AKAP450 impide la activación completa del complejo TCR/CD3 y la señalización posterior desencadenada	72
2.5. Implicación de AKAP450 en la dinámica del citoesqueleto del linfocito T	76

2.6. La supresión de la función de AKAP450 impide la secreción polarizada de IL-2 durante la formación de la sinapsis inmune	80
 DISCUSIÓN	
1. Dineína/Dinactina	85
1.1. El complejo dineína/dinactina y el citoesqueleto de tubulina en el linfocito T: translocación del MTOC a la sinapsis inmune	85
1.2. El complejo dineína/dinactina y la maduración de la sinapsis inmune: control de la señalización sostenida del linfocito T por parte del MTOC	87
2. AKAP450	90
2.1. AKAP450 y su papel regulador en la reorganización de las integrinas en la sinapsis inmune: posible anclaje del MTOC	90
2.2. AKAP450 en el linfocito T: su papel regulador a distintos niveles	91
3. El MTOC como plataforma de señalización esencial para la activación del linfocito T	93
 CONCLUSIONES	 99
 BIBLIOGRAFÍA	 103
 ANEXO I: Texto suplementario	 119
 ANEXO II: Artículos publicados	 123
 ANEXO III: Artículos de la tesis	 127

ABREVIATURAS

Para las abreviaturas se ha utilizado la nomenclatura española en aquellos casos en los que existe, y la inglesa para el resto de casos. Muchos acrónimos corresponden a palabras en inglés.

ADAP: Adhesion and Degranulation-promoting Adapter Protein
AKAP: A-Kinase Anchoring Protein (proteína de anclaje de PKA)
APC: Antigen Presenting Cell (célula presentadora de antígeno)
BSA: Bovine Serum Albumin (albúmina bovina de suero)
CDC42: Cell Division Cycle 42
DHC: Dynein Heavy Chain (cadena pesada de dineína)
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
ERMs: The ezrin/radixin/moesin family proteins
GEF: Guanine nucleotide exchange factor
GFP: Green Fluorescence Protein (proteína fluorescente verde)
G418: Geneticina
HA: Hemagglutinin (hemaglutinina)
HDAC6: Histone deacetylase 6 (histona deacetilasa 6)
ICAM: Intercellular Adhesion Molecule (molécula de adhesión intercelular)
IL-2: Interleuquina 2
LAT: Linker of activated T cells
MHC: Major Histocompatibility Complex (complejo mayor de histocompatibilidad)
MTOC: Microtubule-Organizing Center (centro organizador de microtúbulos)
PBLs: Peripheral Blood Lymphocytes (linfocitos de sangre periférica)
PBMCs: Peripheral Blood Mononuclear Cells (células mononucleares)
PBTs: Peripheral Blood T Cells (células T de sangre periférica)
PBS: Phosphate Buffered Saline
PCM: Pericentriolar Material (material pericentriolar)
PHA: Phytohemagglutinin (fitohemaglutinina)
PLC γ 1: Phospholipase C, gamma 1 (fosfolipasa C γ 1)
PP: Protein Phosphatase (fosfatasa)
SEB: Superantígeno B
SEE: Superantígeno E
SI: Sinapsis Inmune
siRNA: small interfering RNA

SMAC: Supramolecular Activation Cluster (complejo supramolecular de activación)

VCAM: Vascular Cell Adhesion Molecule (molécula de adhesión vascular)

VLA-4: Very Late Antigen-4 (antígeno de activación muy tardía 4)

WB: Western Blot

TCR: T cell receptor (receptor de célula T)

ZAP70: ζ chain-associated protein kinase 70

γ -TURC: γ -Tubulin Ring Complex

INTRODUCCIÓN

1.- RESPUESTA INMUNE: PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA Y ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T.

Tras el ataque de un agente infeccioso, el organismo es capaz de defenderse en dos fases, una inicial innata y una más tardía que implica mecanismos de inmunidad adaptativa. La primera fase innata comprende gran variedad de mecanismos de defensa no específicos tales como: 1) el pH de la piel y proteasas presentes en la saliva; 2) células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) y linfocitos citolíticos naturales (NK, *natural killer*); 3) proteínas de la sangre, que incluyen el sistema del complemento y otros mediadores de la inflamación y 4) citoquinas que regulan numerosas actividades de las células de la inmunidad innata. Posteriormente, si el patógeno consigue sobrepasar las barreras mencionadas anteriormente, entra en acción la inmunidad adaptativa, denominada así porque se produce como respuesta a una infección específica y se adapta a ésta.

La respuesta inmune adaptativa reside en los linfocitos, capaces de reconocer y responder de forma específica a antígenos extraños. Los linfocitos B son las células productoras de anticuerpos específicos, que pueden ser secretados al medio. Los linfocitos T $CD8^+$ citotóxicos realizan su función defensiva eliminando las células que presentan antígenos extraños, como las células infectadas por virus u otros microorganismos intracelulares. Por el contrario, los linfocitos T $CD4^+$ colaboradores (Th, *T helper*) proporcionan una importante conexión entre la inmunidad específica y los mecanismos efectores de la inmunidad natural, promoviendo la proliferación y diferenciación de otros linfocitos y activando y reclutando células de la respuesta inmune innata.

Para llevar a cabo su función efectora, tanto los linfocitos T $CD4^+$ como los $CD8^+$ deben reconocer un antígeno específico para su receptor de células T (TCR). Dicho antígeno ha de estar asociado al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) correspondiente, expuesto en la membrana de la célula presentadora de antígeno (APC). Este proceso conlleva una serie de cambios a nivel molecular y estructural en la célula T que desembocan en la activación del linfocito.

1.1- Fases de la interacción célula T-APC.

La interacción entre un linfocito T y la APC involucra la activación secuencial de una cadena de eventos celulares (**Figura 1**). Inicialmente, de forma independiente de antígeno, la célula T explora la superficie de la APC y el contacto inicial entre ambas provoca la redistribución de moléculas de adhesión tales como LFA-1, ICAM-1 e ICAM-3 (Fase 1)

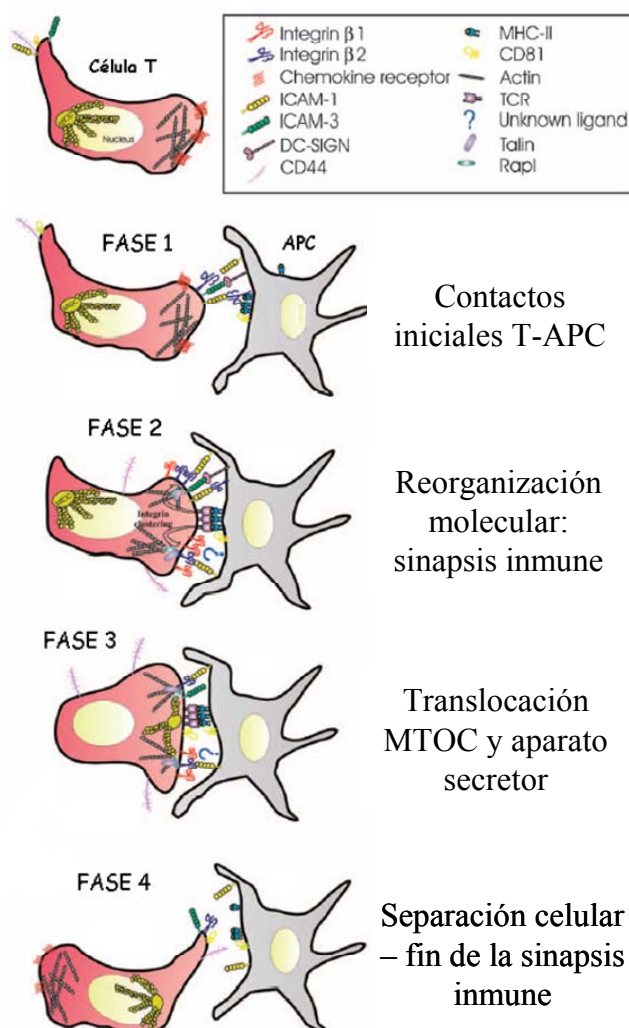


Figura 1: Fases de la interacción entre el linfocito T y la APC. El linfocito T contacta con la APC y explora su superficie en busca de complejos péptido-MHC específicos, fase en la que juegan un papel fundamental diferentes moléculas de adhesión (Fase 1). Tras el reconocimiento del antígeno, se produce la estabilización del conjugado T-APC, con la consiguiente redistribución molecular: el par LFA-1/ICAM-1 es excluido del área central del contacto, mientras que los agregados TCR-MHC se localizan en dicha parte (Fase 2). A continuación, la maquinaria de secreción y el centro organizador de microtúbulos (MTOC) del linfocito T se orientan a la zona de contacto entre células (Fase 3). Finalmente, la separación del linfocito T y la APC ocurre entre 24-48 horas después del contacto inicial (Fase 4). Imagen adaptada de Barreiro *et al*, *Immunological Reviews*, 2007.

(Grakoui et al., 1999; Irvine et al., 2002; Monks et al., 1998; Montoya et al., 2002a). Varias parejas de moléculas de adhesión están implicadas en estas interacciones adherentes iniciales como son CD2/LFA-3, ó LFA-1/ICAM-1,-3 (Montoya et al., 2002b; Ostermann et al., 2002). Posteriormente, tras el reconocimiento del antígeno por parte del receptor de células T (TCR), se produce la estabilización del par celular T-APC, produciéndose una redistribución molecular muy dinámica en la zona de contacto que permite la organización de la sinapsis inmune (SI) (Fase 2).

En los últimos años, el desarrollo de técnicas de registro de imágenes en tiempo real ha permitido observar la dinámica de formación de la SI y observar que, tras una primera señal activadora para el TCR, se forma un área central rica en integrinas en la zona de contacto con la APC que es rodeada por una pequeña región en la que se agrupan moléculas de TCR en forma de agregados. Inmediatamente, estos microagregados de TCR se desplazan hacia la zona central, dando lugar al complejo supramolecular de activación central (c-SMAC), mientras las integrinas se disponen en la parte periférica organizadas en un anillo adhesivo denominado p-SMAC (complejo supramolecular de activación periférico) (Grakoui et al.,

1999; Monks et al., 1998). Durante este proceso, se desencadena una rápida activación de moléculas de señalización que provocan, entre otros eventos, una drástica remodelación del citoesqueleto del linfocito T, que se traduce en una polimerización activa de actina y la translocación de la maquinaria de secreción, el aparato Golgi y el centro organizador de microtúbulos (MTOC) a la zona de contacto, formándose la denominada sinapsis madura (Fase 3) (Sancho et al., 2002; Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004). Finalmente, aunque aún es objeto de debate, se acepta que son necesarias de 4 a 10 horas de estimulación continua para que el linfocito T desarrolle un programa de activación necesario para proliferar y producir citoquinas (Mempel et al., 2004). La separación del linfocito T y la APC se produce entre las 24 y las 48 horas posteriores al contacto inicial (Fase 4) (Ingulli et al., 1997).

1.2- Estructura de la sinapsis inmune.

La topología del complejo CD3/TCR en la zona de contacto entre la célula T y la APC de forma dependiente de antígeno fue descrita hace más de dos décadas (Kupfer et al., 1987); sin embargo, fue más tarde cuando se descubrió que otros receptores de membrana, además de moléculas intracelulares, se acumulaban y segregaban de diferentes formas en el linfocito T, en la zona de contacto con la APC, dando lugar a una macroestructura altamente especializada denominada sinapsis inmunológica (Grakoui et al., 1999; Monks et al., 1998). Se ha observado que tanto los receptores implicados en el reconocimiento antigénico como los receptores de adhesión no se distribuyen aleatoriamente en la zona de contacto sino de forma muy regulada, tanto espacial como temporalmente. De este modo, tras los primeros contactos entre la célula T y la APC, se organizan dos estructuras concéntricas conocidas como SMACs. La SI consiste en un núcleo central c-SMAC, donde se acumula el complejo CD3/TCR y moléculas coestimuladoras, y rodeando al c-SMAC, un anillo periférico de función adhesiva en que se localiza la integrina LFA-1 (p-SMAC), anclada al citoesqueleto de actina a través de la proteína talina (Dustin et al., 1998; Monks et al., 1998). A su vez, en la APC, los complejos péptido-MHC (p-MHC) se acumulan en la parte central del contacto donde interaccionan con el complejo CD3/TCR. En la APC, ICAM-1, que interacciona con LFA-1 dando estabilidad al conjugado, se organiza en un área circular, rodeando a los complejos p-MHC (de la Fuente et al., 2005). Simultáneamente, dentro de la célula T, moléculas de señalización como Lck, Fyn, ZAP-70 y PKC- θ se reclutan en la zona de contacto (Krummel et al., 2000; Monks et al., 1998). En los últimos años, se han estudiado numerosas moléculas localizadas en el c-SMAC, mientras que en el p-SMAC sólo LFA-1 y

talina eran conocidas; sin embargo, se está comprobando la importancia de otras moléculas como VLA-4, ADAP y el receptor de transferrina (Batista et al., 2004; Mittelbrunn et al., 2004; Wang et al., 2004).

Por otro lado, tras la estimulación antigénica, se forma un polo distal rico en actina (DPC), opuesto a la SI, donde se acumulan algunas proteínas que podrían actuar como potenciales reguladores negativos de la activación del linfocito T como por ejemplo CD43 (Huang and Burkhardt, 2007). En este contexto, las proteínas adaptadoras ERMs, que conectan el citoesqueleto de actina con la membrana plasmática, parecen desempeñar un papel importante regulando la deslocalización de dichas proteínas de la SI mediante su interacción con las mismas (Delon et al., 2001). (**Figura 2**).

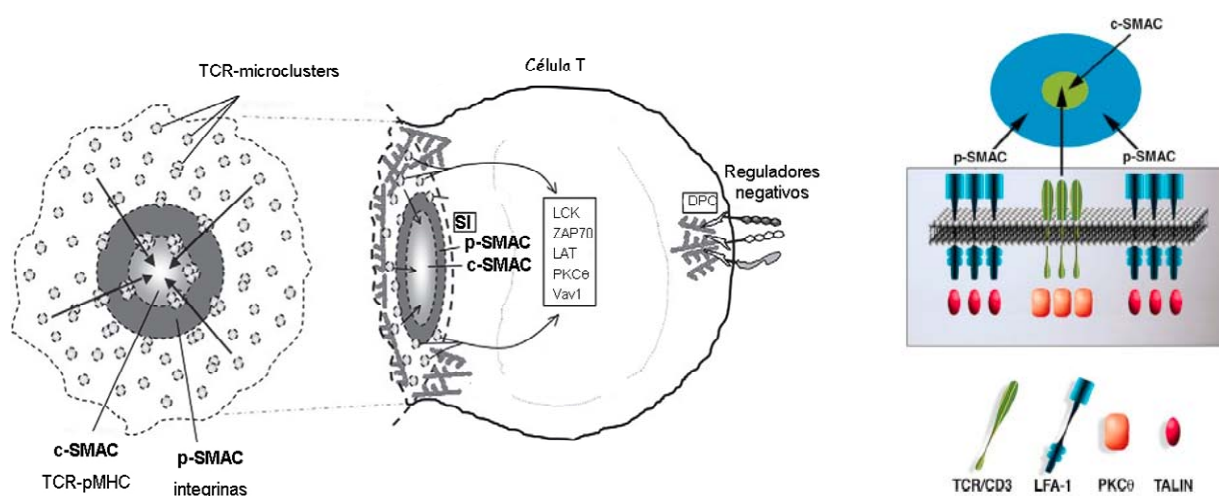


Figura 2: Estructura de la sinapsis inmunológica. El contacto entre la célula T y la APC conlleva la formación de la sinapsis inmune. En la parte central se acumulan el complejo CD3/TCR y diferentes moléculas coestimuladoras y señalizadoras (c-SMAC), mientras que en la parte periférica se acumula la integrina LFA-1 y sus ligandos, dando lugar a un anillo adhesivo que rodea al área central (p-SMAC). Adicionalmente, diferentes moléculas que pueden actuar como reguladores negativos son excluidas del contacto entre células y se acumulan en el polo opuesto de la sinapsis inmune. Imagen adaptada de Timothy S. Gomez and Daniel D. Billadeau, *Advances in Immunology*, 2008.

1.3- Función de la sinapsis inmune en la activación del linfocito T.

¿Qué papel puede estar jugando la reorganización de moléculas en la zona de contacto y la consiguiente formación de la sinapsis inmune?. Una de las hipótesis iniciales propuso a la SI como gran plataforma para facilitar la señalización del TCR, dada la gran concentración de complejos TCR/p-MHC (Bromley et al., 2001), favoreciendo la señalización mantenida de las células T. Sin embargo, se ha descrito que numerosos eventos relacionados con la activación del TCR, tales como la activación de tirosina-quinasa, la movilización de calcio intracelular o la polimerización de filamentos de actina (F-actina),

preceden a la formación de la SI (Lee et al., 2002). El origen de esta señalización inmediata ha sido aclarado recientemente con el descubrimiento de los microagregados de TCR, capaces de asociarse a moléculas de señalización como LCK, ZAP70 y LAT, entre otras, y desencadenar la activación de las vías de señalización desde la parte periférica de la SI (Bunnell et al., 2002). Posteriormente, estos microagregados se translocan y fusionan en la zona central del contacto, conformando el c-SMAC; sin embargo, este flujo a la zona central molecular correlaciona con una disminución en la fosforilación de LCK o ZAP70, sugiriendo que la formación del c-SMAC provoca la atenuación de la ruta del TCR (Campi et al., 2005; Yokosuka et al., 2005). Por tanto, la SI no actuaría únicamente como plataforma para la amplificación de las vías de señalización que se inician con la activación del TCR, sino que su papel también sería regulador de esas señales. El funcionamiento de la SI promovería el reciclaje de los complejos señalizadores en el contacto T-APC, estabilizando la señal del TCR durante períodos largos de tiempo, requeridos para la activación nuclear del linfocito T (Delon and Germain, 2000). Por otro lado, la SI podría estar involucrada en la terminación de la señal mediante endocitosis del TCR y otros receptores, atenuando la señal inicial del TCR (Valitutti et al., 1997).

Sin embargo, ¿es ésta la función de la sinapsis inmunológica? Una posibilidad es que el reagrupamiento en SMACs sea necesario para la regulación y organización de la secreción polarizada tanto de citoquinas como de gránulos líticos por parte de las células T. Así, las células que forman sinapsis maduras (los linfocitos T y las células NK) descargarían de forma coordinada el contenido de las vesículas congregadas en la zona de contacto con la APC, mientras que los timocitos y las células que no desarrollan sinapsis maduras no inducen una secreción polarizada hacia la APC (Davis and van der Merwe, 2001). Finalmente, es posible que la SI actúe como plataforma de anclaje y activación para distintas moléculas implicadas en fenómenos de señalización secundarios, como la expresión de receptores de citoquinas o la activación de moléculas coestimuladoras, tales como ICOS y CTLA-4 (Hutloff et al., 1999).

Por tanto, aunque la función exacta de la SI no ha sido definida, es probable que se trate de una combinación de las anteriores y no de una única actividad. Así, la SI actuaría como un sistema complejo abierto, formado por elementos relacionados de forma dinámica y organizados en agregados que facilitarían el intercambio de energía e información entre la célula T y la APC, así como entre la membrana de la célula T y sus elementos citosólicos (moléculas de señalización, estructurales y elementos de generación de energía y de secreción) y nucleares (factores de transcripción y expresión de genes).

2.- EL CITOESQUELETO CELULAR DURANTE LA ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T.

El citoesqueleto de la célula T está compuesto por F-actina, microtúbulos y filamentos intermedios. Cada uno de estos componentes desempeña un papel diferente en la regulación de la función celular. Los filamentos de actina controlan la morfología celular y plasticidad, y promueven la motilidad de la célula (Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004). Por otro lado, el citoesqueleto de tubulina regula la secreción polarizada de moléculas efectoras de la célula T y podría contribuir a la endocitosis de receptores (Sancho et al., 2002). En el caso de los filamentos intermedios se ha visto que la vimentina tiene un papel importante en la adopción de la forma esférica, confiriendo soporte y rigidez a la célula. (Nieminen et al., 2006).

El análisis de la pérdida de función de proteínas reguladoras del citoesqueleto ha mostrado el papel que éste juega en la activación de la célula T (Badour et al., 2003; Tybulewicz, 2005). Estos estudios demuestran que el citoesqueleto es una plataforma necesaria para el reclutamiento de moléculas que regulan la adhesión celular y la transducción de señales, todas ellas necesarias para el desarrollo, activación y proliferación del linfocito T.

2.1- Polarización del citoesqueleto durante la activación del linfocito T.

Tras el contacto entre el linfocito T y la célula presentadora, las señales derivadas del TCR desencadenan una rápida polarización del citoesqueleto de la célula T que implica la polimerización de F-actina (Ryser et al., 1982) y la reorientación del centro organizador de microtúbulos (MTOC) a la zona de contacto (Kupfer and Dennert, 1984; Kupfer et al., 1987b). A pesar de que estos procesos se conocen desde hace más de 25 años, los mecanismos que controlan dichos eventos aún no se conocen de forma específica. Sin embargo, la reorganización del citoesqueleto es esencial para la función de la célula T.

2.2- Papel del citoesqueleto en la formación de la sinapsis inmune y la activación del linfocito T.

Tanto los microfilamentos de actina como los microtúbulos se requieren para la formación de la sinapsis inmunológica. La integrina LFA-1, presente en el c-SMAC en las fases iniciales de su formación de la SI, se une al citoesqueleto de actina mediante talina (Sampath et al., 1998), y esta interacción podría dirigir el movimiento de LFA-1 hacia el p-SMAC. Otras moléculas de adhesión, tales como CD43 o PSGL1, son excluidas de la SI a través de la interacción con las ERMs, proteínas de conexión con el citoesqueleto de actina

(Huang and Burkhardt, 2007; Montoya et al., 2002b), Por otro lado, la rápida acumulación de los microagregados del TCR en el c-SMAC, no es explicable desde el punto de vista de la simple difusión (Moss et al., 2002), lo que sugiere que el movimiento de moléculas del TCR en la membrana plasmática puede estar influido por el citoesqueleto. Además, la ausencia de F-actina o la pérdida de diferentes componentes reguladores del citoesqueleto impiden la formación de la SI y la activación de la célula T (Campi et al., 2005; Turner and Billadeau, 2002; Valitutti et al., 1995).

Por otro lado, el papel de los microtúbulos en la formación de la SI es menos conocido. La translocación del centro organizador de microtúbulos (MTOC) a la zona de contacto entre células favorece la redistribución del aparato secretor, fundamental para la secreción polarizada de citoquinas (Kupfer et al., 1991). Adicionalmente, se ha demostrado que la translocación del MTOC es esencial para la función normal de los linfocitos T citotóxicos (CTLs) (Kupfer et al., 1985) donde los gránulos líticos, que contienen perforinas y granzimas, se mueven con el MTOC, dirigiéndose así a la SI, favoreciendo la acción eficiente de los CTLs (Stinchcombe et al., 2006).

2.3- Citoesqueleto de actina.

Todas las células eucariotas contienen actina, que se puede hallar en forma soluble (G-actina) o bien organizada en microfilamentos (F-actina). Los extremos de la F-actina presentan una capacidad de polimerización distinta, según se trate del extremo (+), de mayor crecimiento, o del extremo (-), de menor crecimiento (Bonder et al., 1983). En este proceso el ATP desempeña un papel esencial, hallándose la G-actina acomplejada al mismo cuando se incorpora al filamento de F-actina, liberándose actina-ADP en la posterior despolimerización. El descubrimiento del complejo regulador Arp2/3 y su función en la nucleación de los nuevos filamentos de actina supuso un gran avance en la comprensión de dicho proceso. La F-actina sufre procesos dinámicos de polimerización y despolimerización durante la activación celular gracias a la actividad de distintas proteínas asociadas a ella. El complejo Arp2/3 se une a los extremos (-) y nuclea la formación de nuevos filamentos creando nuevos extremos positivos (+) (Mullins et al., 1998), organizándolos espacialmente y localizándolos en aquellos lugares de la célula donde la polimerización de actina es un proceso muy activo y necesario, como ocurre en el caso de la SI.

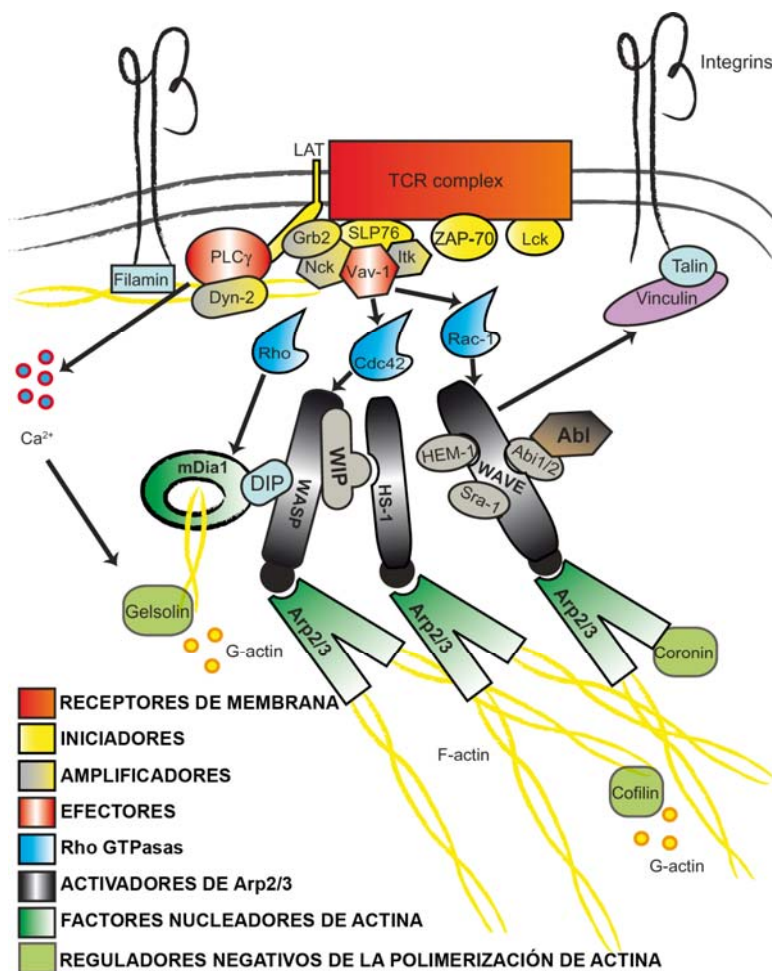


Figura 3: Señalización que regula la polimerización de actina en la sinapsis inmune. La señalización derivada del TCR induce la activación de diferentes proteínas de señalización que llevan a la polimerización rápida de F-actina en la SI. El reclutamiento de VAV1 a la zona de contacto T-APC facilita el intercambio GDP-GTP que activa las Rho GTPasas, implicadas en la activación del complejo nucleador Arp2/3, a través de las proteínas WASP y WAVE2. La proteína HS-1 se activa por diferentes quinasas y también promueve la polimerización de actina vía Arp2/3. Las proteínas gelsolina, coronina y cofilina actúan como factores despolimerizadores de la actina en la SI. Imagen adaptada de Gordón-Alonso et al, *Cell Health and Cytoskeleton*, 2010.

La interacción inicial T-APC conlleva la polimerización de actina en forma de lamelipodio, lo que contribuye a la adhesión intercelular. Este lamelipodio contacta con la APC y la F-actina se distribuye alrededor de la zona de contacto, en la célula T (Bunnell et al., 2001). Distintos trabajos demuestran la importancia de moléculas de señalización dependientes de la activación del TCR en la acumulación de la actina en la SI, como son Lck y ZAP-70 (Morgan et al., 2001), LAT (Bunnell et al., 2001) y SLP-76 (Zeng et al., 2003). Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados directamente en este proceso sólo han empezado a esclarecerse recientemente. Por ejemplo, el factor intercambiador de nucleótidos de guanina, VAV1, es esencial para la acumulación de F-actina, ya que se acumula en la SI, donde regula la actividad de CDC42 y RAC1 (Tybulewicz, 2005), dos GTPasas de la familia de Rho implicadas en la regulación de la actividad del complejo Arp2/3. A través de este papel en la dinámica del citoesqueleto de actina, se ha sugerido que VAV1 controla la formación de la SI, regulando la acumulación del TCR y la proteína quinasa C- θ (PKC θ) (Villalba et al., 2002; Wulfig et al., 2000), entre otros. Por otro lado, el complejo WASP-WIP cumple un papel esencial en la reorganización de la actina en la SI. WASP es un efector de CDC42 que

se une y activa el complejo Arp2/3 (Billadeau and Burkhardt, 2006). Sin embargo, estudios recientes indican que células T deficientes para WASP son capaces todavía de polimerizar actina, además de formar SI normales (Cannon and Burkhardt, 2004), por lo que otros reguladores del complejo Arp2/3 jugarían un papel más importante en el proceso, o podrían compensar su falta. De hecho, se ha descrito recientemente que las proteínas WAVE2 y HS1 actúan como efectores de la reorganización de la actina en células T (Gomez et al., 2006; Nolz et al., 2006).

2.4- Citoesqueleto de tubulina.

Los microtúbulos están formados por heterodímeros de α - y β -tubulina que producen polímeros dinámicos, capaces de variar su longitud mediante la adición o pérdida de dichos heterodímeros de tubulina, de forma dependiente de GTP. Otras isoformas de tubulina poseen funciones más especializadas, como es el caso de γ -tubulina, restringida al centro organizador de microtúbulos (MTOC) o centrosoma, donde juega un papel fundamental en la nucleación de los microtúbulos y en el establecimiento del huso mitótico (Oakley and Oakley, 1989).

A) El centrosoma o centro organizador de microtúbulos (MTOC): estructura y función.

Los centrosomas son orgánulos celulares no membranosos que se encuentran en la mayoría de las células. Ocupan un pequeño volumen ($1-2 \mu\text{m}^3$) cerca del centro de la célula y, normalmente, próximos al núcleo. Se componen principalmente de dos subestructuras: los centriolos y el material pericentriolar (PCM). Los centriolos son estructuras simétricas en forma de barril formados por nueve dobletes o tripletes de microtúbulos, que se disponen de forma perpendicular. El PCM está compuesto por fibras interconectadas y agregados proteicos que forman una matriz altamente dinámica, que integra numerosas proteínas adaptadoras, involucradas en la nucleación de microtúbulos (Dictenberg et al., 1998) y otras actividades. Diferentes aproximaciones proteómicas han establecido la gran variedad de proteínas que se encuentran presentes en el centrosoma (Mann and Jensen, 2003).

Una de las funciones principales del centrosoma dentro de la célula es la nucleación de microtúbulos. Así, se ha demostrado que los microtúbulos crecen a partir de este orgánulo en células tratadas con nocodazol, una sustancia química que promueve la despolimerización de los microtúbulos, una vez que el nocodazol ha sido lavado (Evans et al., 1985). En el centrosoma, la γ -tubulina se localiza en complejos proteicos que adoptan forma de anillo

denominados γ -TURCs (Zheng et al., 1995), de los que parten los microtúbulos de nueva formación.

El centrosoma tiene su propio ciclo de división, que discurre paralelo al nuclear. Los centriolos se duplican y permiten que el PCM sea más denso. El PCM posee, en general, menos capacidad para nuclear microtúbulos durante la interfase, y en la división celular madura, haciéndose más denso mediante transporte activo, que es fundamentalmente dependiente de los motores moleculares como dineína, concentrando complejos proteicos γ -TURCs en el PCM. El centrosoma es fundamental en el ensamblaje y localización del huso mitótico y su anclaje a los polos celulares durante la división. El progreso de la división celular y la transición entre las distintas fases del ciclo dependen de su integridad y composición (Khodjakov and Rieder, 2001; Segal and Bloom, 2001); sin embargo, recientemente se han descrito sistemas donde el centrosoma está ausente, manteniéndose la capacidad para organizar un huso mitótico funcional y llevar a cabo la división celular (Megraw et al., 2001), indicando que los centrosomas pueden ser prescindibles para estos eventos (Hinchcliffe et al., 2001).

Además, los centrosomas actúan como plataformas de anclaje para diferentes proteínas reguladoras, como por ejemplo las proteínas de anclaje de PKA (AKAPs). Mediante la capacidad de interactuar con numerosas moléculas reguladoras, las proteínas adaptadoras AKAPs integran diversas redes de señalización que regulan la fosforilación de sustratos y efectores específicos, esenciales para desencadenar diferentes procesos dinámicos en la célula (Diviani and Scott, 2001). Por ejemplo, se ha descrito un papel importante del centrosoma en la polarización y diferenciación celular, bien mediante su localización en la interfase, como durante la migración linfocitaria (Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004), o durante la división celular, en las divisiones asimétricas (Chang et al., 2007).

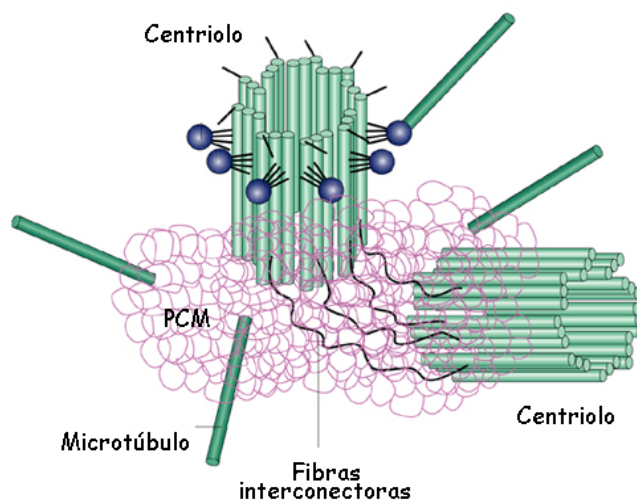


Figura 4: Estructura del centrosoma. El centrosoma está formado por un par de centriolos rodeados de un material proteico denominado material pericentriolar (PCM) desde el cual se nuclean los microtúbulos. Los centriolos se encuentran unidos por una serie de fibras interconectoras, independientes del PCM. Imagen adaptada de Stephen Doxsey, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2001

B) Regulación de la polarización del MTOC durante la activación del linfocito T.

Los elementos reguladores de la localización del MTOC durante la formación de la SI se están caracterizando actualmente. Se han implicado diferentes moléculas de señalización tales como LCK, ZAP70, LAT, SLP76, VAV1, CDC42 y el calcio intracelular en la regulación de dicho proceso (Ardouin et al., 2003; Kuhne et al., 2003; Lowin-Kropf et al., 1998; Stowers et al., 1995). Es el caso de la actividad de la quinasa Fyn, dependiente de la activación del TCR, que controla la reorientación del MTOC durante la estimulación con superantígenos bacterianos en ausencia de LCK. Además, las células T de ratones deficientes para Fyn no son capaces de reorganizar su citoesqueleto de tubulina en respuesta a anti-CD3 (Martin-Cofreces et al., 2006). Sin embargo, en su mayoría, dichas moléculas son componentes de la señalización desencadenada tras la activación del TCR, lo cual puede afectar a numerosos procesos posteriores. Por tanto, el mecanismo directo que controla el movimiento del MTOC tras activación del TCR no está aún completamente definido.

Los estudios recientes han intentado esclarecer que moléculas ejercen un papel directo en la translocación del MTOC a la SI. Por ejemplo, dineína, un motor molecular asociado a microtúbulos, podría participar en la polarización del MTOC a través de su interacción con ADAP que lo localiza en el p-SMAC (Combs et al., 2006). Estas observaciones son interesantes ya que se ha descrito que los microtúbulos se anclan en el p-SMAC durante el contacto entre células proporcionando un posible punto de anclaje para el MTOC durante la activación de la célula T una vez éste se aproxima a la SI (Kuhn and Poenie, 2002). En este sentido, dineína había sido ya implicada en la localización del MTOC durante la migración de células epiteliales y fibroblastos (Palazzo et al., 2001).

Por otro lado, la estabilidad de los microtúbulos podría ser importante para la translocación del MTOC. La activación del TCR conlleva una rápida deacetilación de los microtúbulos, de la que es responsable la histona-deacetilasa 6 (HDAC6), con actividad deacetilasa sobre la tubulina. Posteriormente, la acetilación se recupera en tiempos más largos de estimulación (Serrador et al., 2004). HDAC6 se localiza en la SI durante la estimulación antigénica; su sobreexpresión provoca una deslocalización del MTOC y una menor producción de IL-2 por parte de la célula T. Además, la redistribución del TCR es deficiente, conformándose una sinapsis inmune no funcional (Serrador et al., 2004). Estos trabajos sugieren un papel fundamental de los microtúbulos y la translocación del MTOC en la organización y arquitectura final de la sinapsis inmune.

En este sentido, se han estudiado moléculas que conectan el citoesqueleto de actina y tubulina como potenciales reguladores de la polarización del MTOC en las células T. Es el caso de las

forminas, que estimulan la nucleación de actina y se unen a los extremos (-) de los microtúbulos. Las forminas FMNL1 y mDIA1 colocalizan cerca del centrosoma y controlan la polarización del MTOC, de forma independiente de Arp2/3. Tanto la ausencia de FMNL1 como de mDIA1 afectan al movimiento del MTOC, sugiriendo que no actúan de forma redundante (Gomez et al., 2007). Estos datos indican que distintos procesos de polimerización de actina, controlados por la familia de las forminas, pueden ser requeridos para la polarización del MTOC.

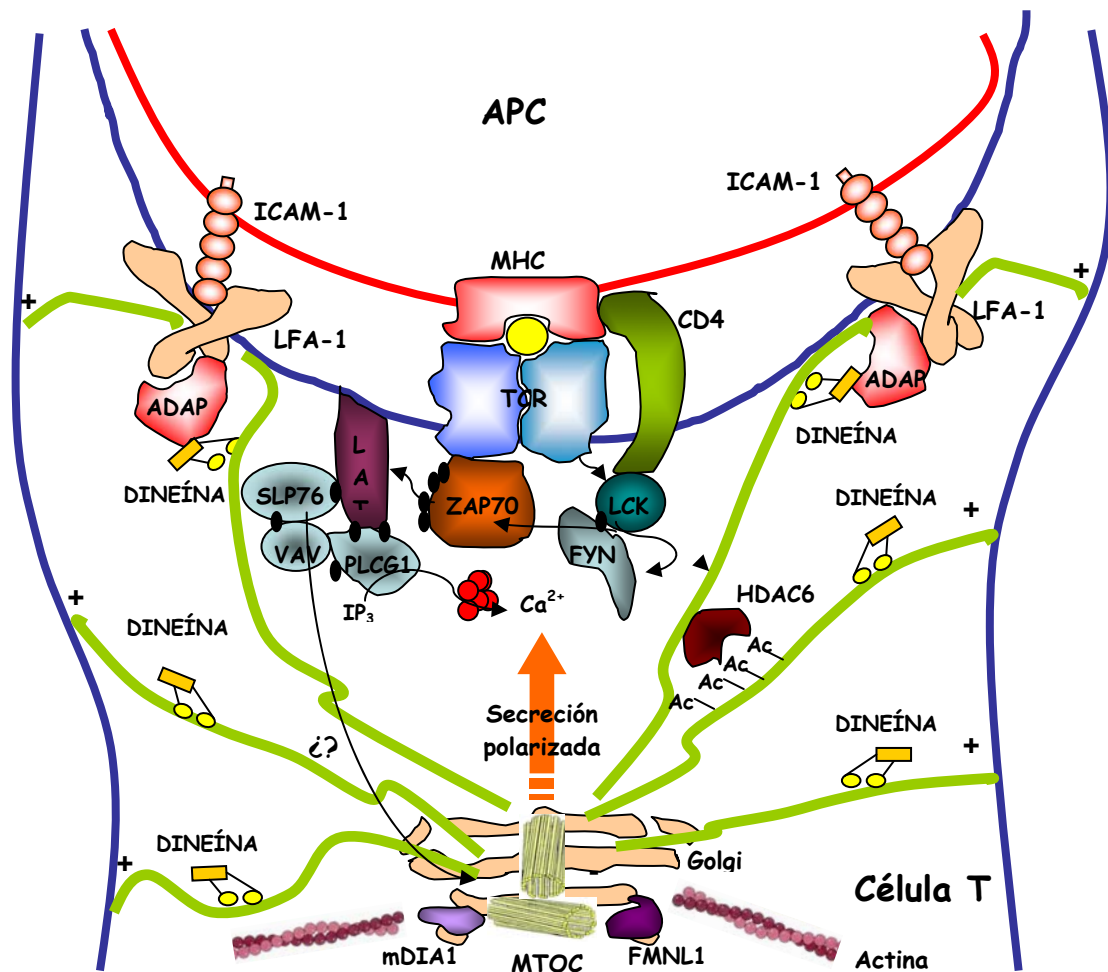


Figura 5: Regulación de la polarización del MTOC tras activación del TCR. Tras el reconocimiento antigénico, el MTOC se reorienta a la zona de contacto entre la célula T y la APC. Diferentes eventos proximales a la activación del TCR se han implicado en la regulación del movimiento del MTOC, incluyendo la activación de diferentes quinasas; sin embargo, la conexión directa es poco conocida (¿?). Por otra parte, el complejo dineína-ADAP presente en el p-SMAC podría promover el movimiento y posterior anclaje del MTOC en la SI. La acetilación/deacetilación de microtúbulos a través de HDAC6 juega un papel fundamental en la estabilidad de los mismos y en la correcta translocación del MTOC. Recientemente, diferentes proteínas asociadas a la dinámica del citoesqueleto de actina (forminas) parecen tener un función relevante en dicho proceso.

3.- EL COMPLEJO MOTOR ASOCIADO A MICROTÚBULOS DINEÍNA/DINACTINA.

Las células se organizan en diferentes compartimentos que necesitan estar en continua comunicación, intercambiando componentes. Los motores moleculares son los encargados del tráfico entre estos compartimentos. En concreto, en la célula se pueden distinguir tres tipos de transportadores: miosinas, quinesinas y dineínas, que usan el citoesqueleto celular como raíles para llevar a cabo su función. En general, los filamentos de actina son usados por las diferentes miosinas, mientras que quinesinas y dineínas se desplazan sobre los microtúbulos. Para el transporte de vesículas, orgánulos y demás componentes aislados, el motor se une a un determinado cargo a través de su tallo y, de forma simultánea, al citoesqueleto a través de sus cabezas generadoras de energía. A partir de aquí, el motor se mueve usando ciclos repetidos de unión/desunión de sus cabezas, todo ello gracias a la energía generada por la hidrólisis de ATP (Mallik and Gross, 2004).

3.1- Dineína: caracterización y estructura.

El número de motores moleculares descrito es extenso; aunque al menos existen 14 clases de quinesinas y 17 clases de miosinas. En el caso de las dineínas se han definido dos tipos fundamentales: la dineína axonemal, responsable del movimiento de los cilios y flagelos, y la dineína citoplasmática, involucrada en el transporte intracelular, la mitosis, la polarización y el movimiento de la célula (Hook and Vallee, 2006).

La dineína es un macrocomplejo proteico compuesto por dos subunidades de la cadena pesada (*dynein heavy chains*, DHC) de más de 500 KDa, que corresponden al número de cabezas globulares con capacidad motora. Las DHCs están formadas por dos estructuras: el dominio N-terminal que forma la base de la molécula, donde se unen la mayoría de las subunidades accesorias, y el dominio motor, de tipo AAA, con actividad ATPasa. Por otro lado, existe una gran diversidad de subunidades accesorias que se encuentran asociadas al multicomplejo, denominadas cadenas intermedias (ICs, 70-74 KDa), cadenas ligeras intermedias (LICs, 53-59 KDa) y cadenas ligeras (LCs, 10-14 KDa) (Pfister et al., 2005).

Además, la dinactina es otro multicomplejo similar que estimula la función transportadora de dineína (Schroer and Sheetz, 1991), sugiriendo un papel en la regulación de la actividad del motor. Los análisis estructurales de dinactina han mostrado que se compone de diferentes subunidades entre las que destacan p150^{glued} y p50-dinamitina. Se ha descrito la interacción entre p150^{glued} y las cadenas intermedias de dineína, en concreto p74 (Vaughan and Vallee, 1995). Dicha interacción se regula por un mecanismo dependiente de la fosforilación de la

cadena intermedia (Vaughan et al., 2001). Posteriormente, el análisis funcional de p50-dinamitina reforzó la hipótesis del papel regulador de dinactina en la función de dineína, ya que dicha subunidad puede prevenir la actividad del complejo dineína/dinactina a través de su unión a la subunidad p150^{glued} (Burkhardt et al., 1997; Vaughan, 2005). Por ello, la sobreexpresión de p50-dinamitina se emplea experimentalmente para interferir la función de dineína.

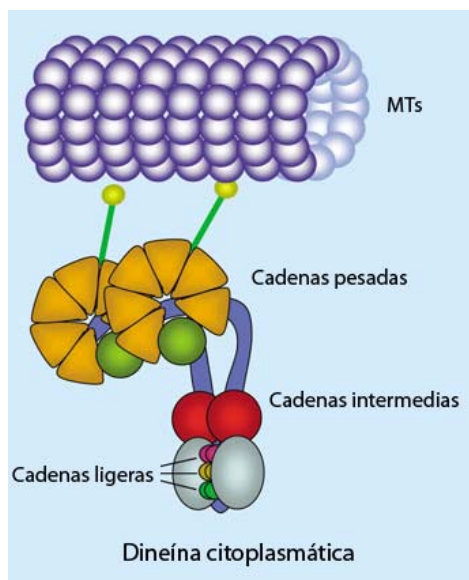


Figura 6: Organización estructural de la dineína citoplasmática. Imagen adaptada de Peter Höök et al, *Journal of Cell Science*, 2006.

3.2- Dineína en la célula: función.

El complejo motor dineína/dinactina ha sido implicado en un amplio espectro de funciones dentro de la célula. Dineína es bien conocida por su papel en el transporte de orgánulos membranosos y no membranosos. Sus funciones incluyen el transporte retrógrado axonal y el posicionamiento de endosomas, lisosomas, retículo endoplasmático, aparato de Golgi y núcleo (Karki and Holzbaur, 1999). Además, este complejo proteico se localiza en el cinetocoro, donde se ha implicado en el anclaje de los microtúbulos y desde donde su actividad puede contribuir al movimiento de los cromosomas durante la anafase (Howell et al., 2001; Savoian et al., 2000; Sharp et al., 2000).

Por otro lado, evidencias recientes indican que dineína puede estar implicada en la dinámica del citoesqueleto cortical en las células de vertebrados. Por ejemplo, durante la mitosis, se localiza en la corteza celular desde donde mantendría la tensión de los microtúbulos del huso mitótico y su orientación en el citosol (Busson et al., 1998). Durante la migración de fibroblastos para rellenar la herida en experimentos de cicatrización, las células en el borde de la herida reorientan su centrosoma, la red de microtúbulos y el aparato de Golgi hacia la dirección a la que migran. Durante este proceso, la inyección de anticuerpos bloqueantes anti-dineína o la sobreexpresión de p50-dinamitina previene la polarización del centrosoma

(Palazzo et al., 2001). Hay que reseñar que la reorientación del centrosoma y de los microtúbulos asociados con la cicatrización de la herida requiere la activación de la GTPasa CDC42. Esta observación también se ha demostrado en el caso del contacto de las células T y células presentadoras de antígeno (Stowers et al., 1995). Recientemente, se ha visto que la cadena intermedia de dineína interacciona con ADAP, que la localiza en el p-SMAC en la SI (Combs et al., 2006). ADAP es una proteína adaptadora que media la activación de integrinas durante la estimulación del TCR mediante la proteína SKAP55, y a la dinámica del citoesqueleto de actina (Huang et al., 2005; Krause et al., 2000; Peterson et al., 2001). Mediante el uso de oligos interferentes para ADAP en células T, se ha visto que dineína no se localiza en la SI y, en estas condiciones, el MTOC no es capaz de reorientarse (Combs et al., 2006), mostrando una conexión directa entre el reclutamiento de dineína a la SI y la polarización del citoesqueleto de tubulina.

4.- LA PROTEÍNA ADAPTADORA AKAP450.

La fosforilación de proteínas es un proceso altamente controlado por la acción opuesta tanto de quinasas como de fosfatasas. Actualmente, se acepta que la focalización de la señal de estas proteínas proporciona un mecanismo que asegura la especificidad en la transducción de señales de la célula (Colledge and Scott, 1999). Las evidencias recientes demuestran que la localización subcelular de distintas quinasas y fosfatasas en un proceso determinado se mantiene de manera específica gracias a su interacción con las denominadas proteínas *scaffold* o adaptadoras (Diviani and Scott, 2001). Por ejemplo, las proteínas de anclaje de la proteína quinasa A (PKA) (*A-kinase anchoring proteins* - AKAPs) son capaces de controlar la organización intracelular de dicha quinasa. En nuestro estudio se ha investigado el papel de AKAP450 en la formación de la SI, una proteína adaptadora para PKA que se localiza en el centrosoma.

4.1- AKAPs: estructura y función.

Los niveles de AMP **cíclico** (AMPC) y las cascadas de señalización dependientes de los mismos constituyen uno de los eventos más caracterizado en el campo de la activación intracelular (Sutherland, 1972). En estas vías de señalización, la activación de la PKA es esencial. El AMPC se une a las subunidades reguladoras de PKA, disociándose las subunidades que ejecutan la acción. La PKA se acumula en la membrana o diferentes orgánulos a través de la interacción de la subunidad reguladora con distintos miembros de la familia de las AKAPs. Dicha familia de proteínas contiene al menos dos motivos funcionales.

El dominio de unión a PKA forma una hélice anfipática que es capaz de interaccionar con los elementos hidrofóbicos de la subunidad reguladora de PKA (Newlon et al., 1999). Por otro lado, cada AKAP posee un dominio que dirige al complejo PKA-AKAP hacia un compartimento celular concreto (Colledge and Scott, 1999). Por ejemplo, AKAP79, una de las primeras AKAPs descritas, posee tres dominios que facilitan su asociación con fosfolípidos de membrana en la membrana plasmática (Dell'Acqua et al., 1998). Sin embargo, la propiedad que hace más interesante a este tipo de proteínas es su capacidad para unir de forma simultánea diferentes quinasas y fosfatasa (Smith et al., 2006), conformando multicomplejos proteicos. Estos macrocomplejos incluyen proteínas que desencadenan o que paran una determinada señal. Por ejemplo, la señal de AMPc se regula por AKAPs mediante su interacción con miembros de la familia de las adenil ciclasas, las cuales sintetizan AMPc, así como de las fosfodiesterasas (PDEs), que lo metabolizan (Houslay and Adams, 2003).

4.2- AKAPs y centrosoma.

Durante los últimos años, se ha identificado un mayor número de quinasas y fosfatasa en el centrosoma, importantes para la regulación de su función (Bischoff et al., 1998; Nigg, 1998). Sin embargo, las bases moleculares del anclaje al mismo están siendo entendidas actualmente. En el centrosoma se identificó el primer AKAP de forma independiente por tres grupos que la denominaron AKAP350 (Schmidt et al., 1999), AKAP450 (Witczak et al., 1999) y CG-NAP (Takahashi et al., 1999). Posteriormente, se describió una segunda proteína denominada pericentrina, componente del material pericentriolar que forma un complejo macromolecular con γ -tubulina (Dictenberg et al., 1998) y dineína (Purohit et al., 1999), desempeñando un papel esencial en la regulación de la nucleación de microtúbulos. Dicho complejo se asocia a dineína, lo que permite el transporte de los complejos pericentrina - γ -tubulina a lo largo de los microtúbulos en el centrosoma (Purohit et al., 1999).

4.3- AKAP450.

A) Caracterización y función.

Esta proteína miembro de la familia de las AKAPs se identificó en una fracción centrosomal (Colledge and Scott, 1999), con un peso aparente de 350 KDa (Keryer et al., 1993) y posteriormente fue reconocida como AKAP450 (Schmidt et al., 1999; Takahashi et al., 1999; Witczak et al., 1999). El clonaje y caracterización de la misma revelaron que poseía dominios de unión a PKA, un dominio de unión para la quinasa PKN, que es activada

por Rho y ácidos grasos, y diferentes sitios de anclaje para las fosfatasa PP1 y PP2A (Takahashi et al., 1999). También se describió la interacción de AKAP450 con la isoforma inmadura, no fosforilada, de PKC ϵ , siendo esta interacción necesaria para su posterior maduración (Takahashi et al., 2000). En conjunto, estos hallazgos indicaron que AKAP450 proporcionaba un punto de integración de distintas vías de señalización, incluyendo la participación de AMPc, Rho, ácidos grasos y fosfolípidos. Posteriormente, se describió la asociación de AKAP450 con fosfodiesterasas; en concreto, con PDE4D, que junto con PKA constituyen en el centrosoma una unidad que podría estar implicada en la regulación local de la señal del AMPc (Tasken et al., 2001).

Por otro lado, AKAP450 posee un dominio muy conservado en el extremo C-terminal que proporciona el sitio de anclaje al centrosoma, ya que la fusión de este dominio con otras proteínas determinaba su localización en el centrosoma (Gillingham and Munro, 2000). Sin embargo, la expresión de AKAP450 no está restringida al centrosoma, sino que también se encuentra en el aparato de Golgi (Schmidt et al., 1999). La existencia de diferentes isoformas de AKAP450 mediante procesamiento alternativo explica los diferentes patrones de expresión a nivel de la célula e incluso de compartimentalización, que aún se están estudiando. Se ha descrito que AKAP450 se asocia al Golgi de una manera dependiente de microtúbulos, a través del complejo dineína/dinactina, y que podría estar involucrada en el mantenimiento de la organización del Golgi (Kim et al., 2007; Larocca et al., 2004). Por otro lado, estudios funcionales han mostrado que la sobreexpresión del dominio C-terminal de AKAP450 perturba la función del centrosoma en células HeLa. La localización celular de AKAP450 se modificaba y, con ello, PKA. Esto provocaba fallos en la citocinesis y la detención en G1 del ciclo celular, resaltando la importancia clave de esta proteína adaptadora en el contexto de las funciones que ejerce el centrosoma en la célula (Keryer et al., 2003).

En relación al sistema inmune, son pocos los trabajos que han descrito la función de AKAP450. La migración del linfocito T representa un proceso complejo pero finamente coordinado que implica la concurrencia de interacciones receptor/ligando, cambios drásticos a nivel del citoesqueleto y la activación de numerosas cascadas de señalización intracelulares (Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004). Se ha descrito que AKAP450 forma parte de un macrocomplejo que se ensambla en las células T tras la activación de la integrina LFA-1 y que éste es indispensable para el mantenimiento de la polaridad de la célula y la migración inducida por la integrina LFA-1 (El Din El Homasany et al., 2005).

B) AKAP450: conexión MTOC / aparato de Golgi.

En la mayoría de las células de mamíferos, el aparato de Golgi se caracteriza por una organización en cisternas próxima al centrosoma en interfase, como se observa durante la activación del linfocito T. Esta observación sugiere la existencia de un nexo funcional entre ambos, actualmente poco conocido; sin embargo, estudios recientes han empezado a establecer una relación entre ambos que parece ser bidireccional ya que componentes de cada orgánulo son capaces de regular la función y organización del otro orgánulo: proteínas del Golgi son necesarias para la organización y posicionamiento del MTOC, mientras que proteínas del centrosoma (fundamentalmente aquellas implicadas en la nucleación de microtúbulos) son requeridas para el posicionamiento pericentriolar del Golgi (Sutterlin and Colanzi, 2010). Más importante aún, esta interacción funcional afecta a numerosos procesos celulares como es el caso de la polarización de la célula y la progresión durante la mitosis.

Los microtúbulos tienen un papel dual en la organización del aparato de Golgi. Primero, el conjunto de microtúbulos que se nuclean a partir del Golgi es necesario para su correcta organización en cisternas. Segundo, los microtúbulos centrosomales son los encargados de mantener la posición del Golgi y sirven como raíles para el transporte de las membranas del mismo. Ambos procesos son dependientes del complejo motor dineína/dinactina (Thyberg and Moskalewski, 1999). En otros casos, diferentes proteínas del Golgi desempeñan funciones en las que el centrosoma juega un papel esencial. La proteína de Golgi GRASP65, implicada en la reorganización del orgánulo, es necesaria para la formación del huso mitótico y la progresión correcta del ciclo celular (Sutterlin et al., 2005). Además, la polarización del centrosoma es dependiente de la fosforilación de GRASP65, ya que mediante el uso de una forma no fosforilable de dicha proteína, el complejo MTOC/aparato de Golgi no se reorienta durante la migración celular (Bisel et al., 2008).

Por otro lado, aunque el centrosoma es el mayor sitio de nucleación de microtúbulos en la célula, diferentes estudios indican que los microtúbulos de nueva síntesis a partir de γ -tubulina se generan en el aparato de Golgi (Efimov et al., 2007), donde los complejos γ -TURCs serían reclutados por la proteína de Golgi GMAP210, con capacidad para anclar microtúbulos (Rios et al., 2004). En este contexto, AKAP450 también desempeña un papel esencial ya que se recluta al Golgi a través de GM130, permitiendo la nucleación de microtúbulos (Rivero et al., 2009). Por tanto, AKAP450 podría actuar como nexo funcional entre el MTOC y el aparato de Golgi, y su papel en la nucleación de microtúbulos en la cara cis del Golgi podría ser importante para la funcionalidad y posicionamiento de ambos orgánulos.

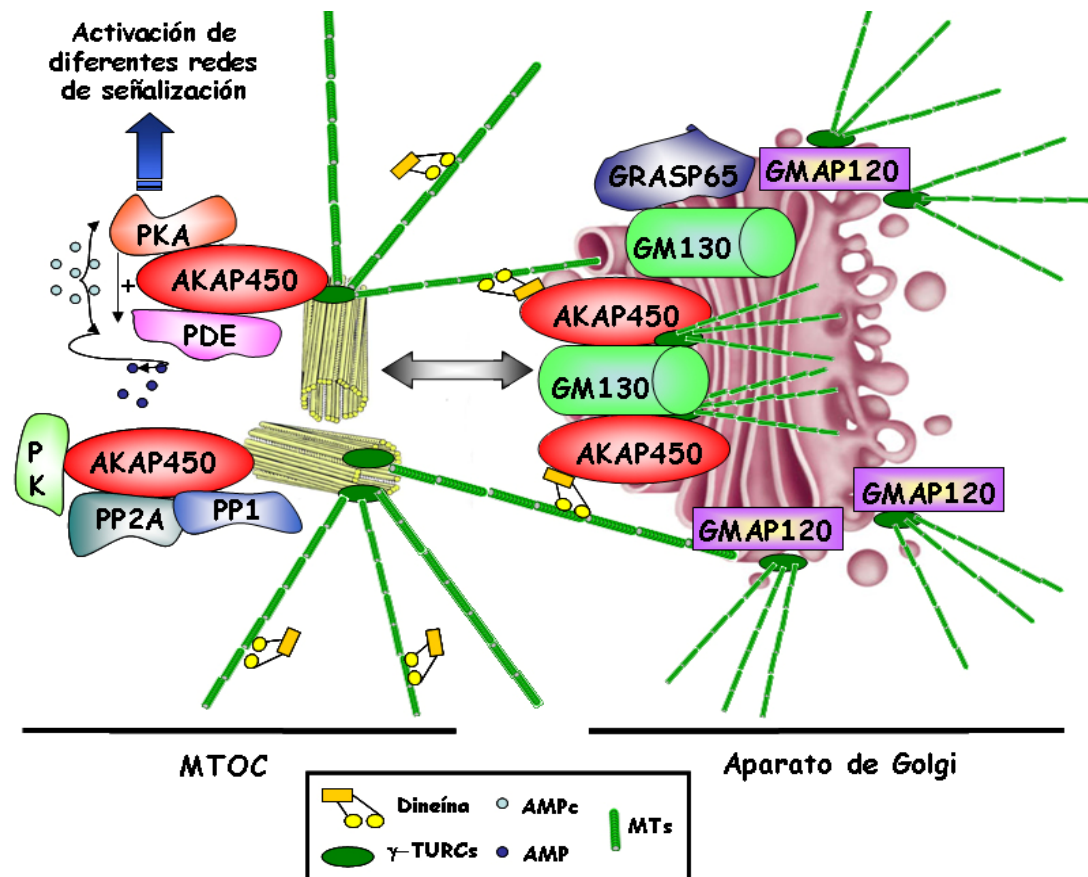


Figura 7: AKAP450 en la célula: relación MTOC/aparato de Golgi. En el esquema se representa la relación existente entre el centrosoma y el aparato de Golgi mediante diferentes proteínas presentes en ambos orgánulos. Proteínas del Golgi como GRASP65 o GM130 regulan tanto la morfología como la función del centrosoma. Además, GMAP120 es capaz de reclutar complejos γ -TURCs al Golgi, localizando sitios de nueva nucleación de microtúbulos fuera del centrosoma. En este contexto, AKAP450 parece desempeñar un papel importante ya que a través de la interacción con GM130 se localiza en el Golgi y sirve como punto de nueva nucleación de microtúbulos. A su vez, se representan las distintas proteínas que interaccionan con AKAP450 en ambos orgánulos, donde destaca PKA, actuando como proteína adaptadora para el metabolismo del AMPc y su señalización, y otras muchas moléculas (quinasas y fosfatasa) que se han mencionado en el texto. MTs: microtúbulos.

OBJETIVOS

Se han planteado los siguientes objetivos a desarrollar a lo largo de la tesis:

1. El estudio funcional del **complejo motor dineína/dinactina** en la activación del linfocito T tras el reconocimiento del antígeno.
 - ✓ Caracterización del complejo motor en la sinapsis inmune.
 - ✓ Función del complejo motor en el movimiento del MTOC a la zona de contacto T-APC.
 - ✓ Papel modulador del MTOC en la señalización derivada de la activación del TCR.

2. El estudio de la proteína centrosómica **AKAP450** en la organización de la sinapsis inmune y la activación del linfocito T.
 - ✓ Regulación por AKAP450 de la configuración y activación de la integrina LFA-1 en la sinapsis inmune.
 - ✓ Papel de AKAP450 en la activación del TCR y la señalización posterior que se desencadena.
 - ✓ Papel funcional de AKAP450 en la reorganización del citoesqueleto: translocación del MTOC.

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Células.

Las líneas celulares que se han utilizado en este trabajo son las siguientes:

- ✓ Las células T Jurkat J77cl20 (que poseen el TCR V β 8 específico para superantígeno E (SEE) presentado en el contexto del MHC-II), cultivadas en medio completo (RPMI 1640, Invitrogen) y 10% de suero fetal bovino descomplementado (FBS) (Invitrogen).
- ✓ Las células Jurkat que expresan establemente las distintas construcciones GFP utilizadas. Estos clones se crecen en medio completo y 10% de FBS, suplementado con 1 mg/ml del anticuerpo de selección G418.
- ✓ Las células T CH7C17 (TCR V β 3 específico para el péptido hemaglutinina – HA); fueron cultivadas en medio completo y 10% FBS, suplementado con 400 μ g/ml de higromicina B (Roche Diagnostics GmbH) y 4 μ g/ml de puomicina (InvivoGen).
- ✓ Las células Raji y Hom2, clones de linfoblastos MHC-II⁺. Se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS.
- ✓ Linfoblastos primarios humanos. Se obtuvieron a partir de linfocitos de sangre periférica (PBLs, *Peripheral Blood Lymphocytes*) de donantes sanos voluntarios por centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque. Se separaron los anillos de células mononucleares (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*), se lavaron cuatro veces con suero salino y se resuspendieron en medio RPMI-1640 con 10% FBS. Después, los monocitos se retiraron por dos rondas de adhesión a plástico a 37°C durante una hora. Los PBTs (*Peripheral Blood T lymphocytes*) resultantes se utilizaron directamente para ensayos funcionales o bien se cultivaron dos días en medio RPMI 1640 suplementado con 10% FBS en presencia de SEE (0.5 μ g/ml) para su activación y diferenciación a linfoblastos. Tras 48 h, se retiró el SEE (mediante un lavado) y los linfoblastos se mantuvieron con 50 U/ml de IL-2 humana recombinante (obtenida del *National Institutes of Health AIDS Research and Reference Reagent Program*) durante 8 días más hasta su utilización en los experimentos. La pureza de los linfoblastos utilizados se analizó mediante citometría de flujo.

2.- Reactivos y anticuerpos.

- ✓ Fibronectina humana (FN) y poli-L-lisina (PLL), procedentes de Sigma-Aldrich.
- ✓ Superantígeno E (SEE) y B (SEB) de Toxin Technology. Hemaglutinina (HA) de Sigma-Aldrich.
- ✓ Sondas fluorescentes intracelulares: Las células se marcaron, según las necesidades experimentales, con sondas de Molecular Probes para los ensayos de inmunofluorescencia. El marcaje se realizó en ausencia de suero y a 37°C durante 30 min. La sonda no internalizada se

eliminó lavando las células marcadas dos veces con medio salino y una vez con medio completo. A continuación se nombran las sondas utilizadas (Molecular Probes, Invitrogen):

- Cell Tracker Orange 5-((and-6)-(4-chloromethyl-benzoyl-amino)tetramethylrhodamine)-mixed isomers (CMTMR), que emite en rojo (λ :515 nm).

- Cell Tracker Blue 7-amino-4-chloromethylcoumarin (CMAC), cuya fluorescencia es azul (λ :466 nm).

- ✓ Faloidina acoplada a Alexa 488/568/647 (Sigma-Aldrich): se trata de una toxina capaz de unirse a F-actina con alta afinidad. Se utiliza diluida 1:200 para poder ver el patrón de actina mediante inmunofluorescencia.

- ✓ Ioduro de propidio: utilizado en los ensayos de viabilidad celular.

En cuanto a los anticuerpos utilizados, se mencionan en la siguiente tabla:

ANTICUERPO	ESPECIE	ANTÍGENO	ORIGEN	COMENTARIOS
PRIMARIOS				
T3b	Ratón	CD3 ϵ humano	Laboratorio*	Uso: FACS, IF
TP1/55	Ratón	CD69 humano	Laboratorio*	Uso: FACS
T4	Ratón	CD4 humano	Laboratorio*	Uso: FACS
T8	Ratón	CD8 humano	Laboratorio*	Uso: FACS
TP1/40	Ratón	AlphaL humano	Laboratorio*	Uso: FACS
LIA3/2.1	Ratón	Beta2 humano	Laboratorio*	Uso: FACS, IF
TP1/25	Ratón	ICAM-3 humano	Laboratorio*	Uso: FACS, IF
TS2/16	Ratón	Beta1 humano	Laboratorio*	Uso: FACS, IF
X63	Ratón	-	Laboratorio*	Usado como control
4G10	Ratón	Tirosina fosforilada total	Dr. B. Alarcón	Uso: IF, WB
OKT3	Ratón	CD3 ϵ humano		Usado para activar células T
A24	Conejo	AKAP450	Dr. W.Kemmer	Uso: IF
APA1/1	Ratón	CD3 ϵ (conformación activa)	Laboratorio*	Uso: IF
TS2/4	Ratón	LFA-1 humano	(1)**	Uso: IF
M24	Ratón	LFA-1 humano (conformación activa)	(2)**	Uso: IF

KIM127	Ratón	LFA-1 humano (conformación activa)	(3)**	Uso: IF
448	Conejo	CD3 ζ	Dr. B. Alarcón	Uso: IF
Anti-P-Vav1	Conejo	p-VAV1 Y174	Dr. X. Bustelo	Uso: WB
Vbeta8	Ratón	TCR V β 8	BD	Uso: FACS
JL-8	Ratón	GFP	BD	Uso: WB
Anti-p150	Ratón	p150 ^{glued}	BD	Uso: IF, WB
Anti-p50	Ratón	p50-dinamitina	BD	Uso: IF, WB
Anti-ADAP	Ratón	ADAP	BD	Uso: IF, WB
Anti-α-tubulin	Ratón	Tubulina	Sigma-Aldrich	Normal y conjugada con FITC: IF, WB
Anti-γ-tubulin	Ratón	γ -tubulina	Sigma-Aldrich	Uso: IF
Anti-PKCθ Sc- 13/18	Conejo	PKC θ total	Santa Cruz Biothecnology	Uso: IF, WB
Anti-Lck	Conejo	Lck	Santa Cruz B	Uso: IF
Anti-DHC	Cabra	Cadena pesada dineína	Santa Cruz B	Uso: WB
Anti-LAT	Conejo	LAT total	Millipore	Uso: IF, WB
Anti-P-ERK	Conejo	p-ERK1/2 Thr202/204	Millipore	Uso: WB
Anti-ERK	Conejo	ERK1/2 total	Millipore	Uso: WB
Anti-P-LAT (1,2)	Conejo	p-LAT Y191 (1) p-LAT Y226 (2)	Millipore	Uso: WB
Anti-p74	Ratón	p74: cadena intermedia dineína	Millipore	Uso: IF, WB
Anti-P-LAT (3)	Conejo	p-LAT Y132	Abcam	Uso: WB
Anti-P-ZAP70	Conejo	p-ZAP70 Y315	Abcam	Uso: WB
Anti-ZAP70	Conejo	ZAP70 total	Abcam	Uso: WB
Anti-giantin	Conejo	Giantina	Abcam	Uso: IF
Anti-P-LAT (4)	Conejo	p-LAT Y171	Cell Signaling	Uso: WB
Anti-P-PLCγ1	Conejo	p-PLC γ 1 Y783	Cell Signaling	Uso: WB
Anti-PLCγ1	Conejo	PLC γ 1 total	Cell Signaling	Uso: WB
Anti-P-PKCθ	Conejo	p- PKC θ Thr538	Cell Signaling	Uso: WB
Anti-P-CD3ζ	Conejo	p-CD3 ζ Y83	Epitomics	Uso: WB

SECUNDARIOS				
GAM-488/568/647	Cabra	IgG de ratón	Invitrogen	Uso: IF
GAR-488/568/647	Cabra	IgG de conejo	Invitrogen	Uso: IF
GAM-HRP	Cabra	IgG de ratón	Pierce	Uso: WB
GAR-HRP	Cabra	IgG de conejo	Pierce	Uso: WB
Streptavidin-488-PE-647	-	Biotina	Invitrogen	Uso: IF

Tabla 1: Anticuerpos utilizados durante el desarrollo de la tesis. Uso: FACS (citometría de flujo); WB (*western-blot*); IF (inmunofluorescencia). * Anticuerpos del laboratorio obtenidos como sobrenadantes del cultivo de hibridomas. Se usaron sin diluir para FACS e IF. ** (1) (Sanchez-Madrid et al., 1983); (2,3) (Lu et al., 2001a; Lu et al., 2001b). GAM: *goat anti-mouse*; GAR: *goat anti-rabbit*; HRP: *horseradish peroxidase*; PE: *phicoeritrin*.

3.- Construcciones recombinantes de ADN, oligos de interferencia (siARN) y transfección celular.

Se utilizaron para el desarrollo de la tesis los siguientes vectores de expresión que poseían:

a) ADN codificante para p50-dinamitina-GFP (Echeverri et al., 1996) que fue cedida por el Dr. R. Vallee (Columbia University, New York).

b) ADN codificante para el dominio carboxi-terminal de CG-NAP/AKAP450 acoplado a GFP, descrito anteriormente (El Din El Homasany et al., 2005) y cedido por el Dr. Y. Volkov (Trinity College, Dublin, Ireland).

c) ADN codificante para la proteína Paxilina acoplada a GFP, descrito previamente (Herreros et al., 2000).

Los ADNs mencionados anteriormente se transfectaron de forma transitoria en células T (en torno a 2×10^7) utilizando el sistema de electroporación de Bio-Rad (*Bio-Rad Gene Pulser II electroporation system*). Tras 24 h, tanto las células J77 como las células CH7C17 vivas fueron aisladas mediante centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque y conjugadas con sus respectivas células presentadoras (Raji o Hom2) para los diversos ensayos funcionales. PBTs y linfoblastos se transfectaron utilizando el sistema de Amaxa Biosystems (*Nucleofector electroporation*), seguido de las recomendaciones indicadas por la casa comercial.

En cuanto a los ensayos de interferencia, las células T fueron electroporadas dos veces, un punto a tiempo cero y otro a las 72 h, ya que de esta forma se obtenía el mayor nivel de silenciamiento de las proteínas diana. Las secuencias de oligos de siARN de doble cadena utilizadas a una concentración final de entre 20-40 μM fueron las siguientes:

Proteína diana	Secuencia 5'-3'	Tiempo de interferencia
DHC 1	GCACCGACAUGAUCUUCAATT	72 h + 72 h
DHC 1	CCAGGAGUUUCGACAGUGATT	72 h + 72 h
AKAP450	AACUUUGAAGUUAACUAUCAA	72 h + 72 h

Tabla 2: Relación de oligonucleótidos utilizados para ensayos de interferencia. DHC: *Dynein heavy chain*.

Como control negativo se utilizó un dúplex de ARN diseñado por Eurogentec que no aparee con ningún ARNm eucariota. Posteriormente, las células fueron recogidas y la eficiencia del silenciamiento fue determinada mediante inmunotransferencia (WB: *Western blot*) de lisados totales. Las células se usaron para los distintos experimentos a día seis post-transfección.

4.- Microscopía: inmunofluorescencia.

4.1.- Formación de conjugados celulares: microscopio de fluorescencia y confocal.

Las células B Raji se cargaron con la sonda celular azul fluorescente CMAC en HBSS durante 30 min, en ausencia o presencia de SEE (0.5 $\mu\text{g/ml}$) y se centrifugaron a baja velocidad. Posteriormente, se pusieron en contacto con las células T J77 durante un tiempo de incubación de 20 minutos a 37°C. Por otro lado, las células B Hom2 también se cargaron con CMAC, se incubaron durante 2 h en ausencia o presencia del péptido HA (50 $\mu\text{g/ml}$) o SEB (10 $\mu\text{g/ml}$), y se conjugaron con las células T CH7C17. En este tipo de ensayos, las células T (2×10^5) se mezclan en la misma proporción (1:1) con las células presentadoras en un volumen final de 80 μl , bien resuspendidas, y tras 20 min de incubación, los conjugados se adhirieron a cristales preincubados anteriormente con PLL, en el caso de las Jurkat, o FN para las CH7C17. Las células se fijaron con paraformaldehído al 4% en medio PHEM/sacarosa (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 5 mM EGTA, y 2mM MgCl_2 , pH 6.9) y se permeabilizaron (en los casos en los que era necesario) durante 5 min en 2% paraformaldehído y 0.2% Triton X-100 en PHEM/sacarosa. Los conjugados se bloquearon y tiñeron para los anticuerpos indicados en cada caso. Las células se montaron en solución de Mowiol (Calbiochem) y observaron tanto en un microscopio de fluorescencia convencional como en un microscopio

confocal. Los microscopios y los programas utilizados para la adquisición y análisis de imágenes fueron los siguientes:

- ✓ Fotomicroscopio de Leica DMR con el objetivo HCX PL APO 63/1.32-0.6 (Leica) acoplado a la cámara COHU 4912-501. El programa de adquisición de imágenes utilizado fue QFISH V2.1 (Leica), y las imágenes fueron procesadas mediante Photoshop CS (Adobe).
- ✓ Unidad de escaneo de luz láser confocal (TCS SP5; Leica) acoplada a un microscopio de epifluorescencia invertido (DMI6000; Leica) con el objetivo HCX PL APO 63X/1.40-0.6. Las imágenes adquiridas se procesaron con el programa que acompaña al microscopio (LCS; Leica) o el programa WCIF ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

4.2.- Ensayos de vídeo-microscopía confocal.

Las células presentadoras Raji (5×10^5 ; control e incubadas con SEE), una vez marcadas con CMTMR, se adhirieron a cristales recubiertos con FN y mantenidas en HBSS (2% BSA) en cámaras abiertas Attofluor (Invitrogen) a 37°C y 5% CO₂ de atmósfera, y colocadas en la placa monitorizada del microscopio. Las células Jurkat (5×10^5) se añadieron a la cámara y se capturaron distintas series en el eje Z cada 30 s. Las imágenes fueron adquiridas con el software que acompaña al microscopio (LCS; Leica) y procesadas con WCIF ImageJ. El programa utilizado para generar los vídeos en formato QuickTime (Apple) fue Premiere 6.0 (Adobe).

4.3.- Análisis de la acumulación de una determinada molécula en la sinapsis inmune.

Los conjugados T-APC se formaron como se indica en el apartado 4.1. Posteriormente, se analizaron mediante el software WCIF ImageJ. Usando ROIs (regiones de interés) de la misma área para todas las mediciones, cuantificamos la señal generada por la interacción T-APC en el área de contacto (IS), la señal correspondiente al área de la membrana de la célula presentadora no en contacto con la célula T (B), la señal del área de la membrana de la célula T no en contacto con la célula presentadora (T), y el background (Bg). Posteriormente, restamos la señal Bg al resto de mediciones, y, entonces, obtenemos el ratio de X en la sinapsis inmune en relación con el resto de la célula, de acuerdo con la fórmula $[IS-B]/T$. En este caso, estamos asumiendo que la acumulación de X fue homogénea en la célula presentadora, sin una acumulación adicional en la zona de contacto con la célula T.

4.4.- Cuantificación de la translocación del MTOC.

Las células T se mezclaron con Raji o Hom2 en una proporción 1:1 durante 15 min a 37°C. Los conjugados celulares formados se resuspendieron y adhirieron a cristales de inmunofluorescencia durante un tiempo adicional de 15 min. Posteriormente, se fijaron, permeabilizaron y marcaron para α -tubulina, y se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia. Se consideró que el MTOC estaba translocado cuando se localizaba junto o próximo a la membrana plasmática de la célula T en la zona de contacto con la APC. Al menos unos 300 conjugados se contaron en cada experimento que se muestra. Los resultados se expresan como el porcentaje de conjugados que poseen el MTOC correctamente reorientado en el área de contacto.

5.- Técnicas generales.

5.1.- Inmunotransferencia (*Western Blot*, WB).

Para el análisis de la fosforilación de distintas proteínas durante la formación de la sinapsis inmune, células Raji y Hom2 (1×10^6) se cargaron con los antígenos correspondientes como se indica en el apartado 4, y se conjugaron con 5×10^6 de células Jurkat J77 y CH7C17, respectivamente, a 37°C, durante los tiempos indicados. Tras la incubación, las células se lisaron a 4°C durante 40 min en solución de lisis (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, conteniendo 1% NP-40, 0,2% Triton X-100, 150 mM NaCl), e inhibidores de fosfatasas y proteasas. Los extractos celulares obtenidos se centrifugaron a 2.500 g durante 10 min, y los sobrenadantes se analizaron mediante electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE) a distintos porcentajes de acrilamida/bisacrilamida y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa Trans-Blot (BioRad). Las membranas se bloquearon con albúmina sérica bovina (5%) y se incubaron con los anticuerpos indicados en TBS-Tween 20 (0,1%). Los anticuerpos unidos se detectaron mediante el uso de anticuerpos secundarios acoplados a HRP y se visualizaron mediante los sustratos quimiolumiscentes “SuperSignal West Pico” o “Femto” (Pierce Chemical) en el detector LAS-2000 (Fujifilm). Los análisis densitométricos se realizaron con el programa acompañante ImageGauge 3.46.

5.2.- Inmunoprecipitación.

Para los ensayos de inmunoprecipitación, las células Raji (5×10^6) se cargaron con el antígeno SEE a una concentración de 0.3 μ g/ml durante 20 min a 37 °C y se mezclaron con 10^8 de células Jurkat J77. Tras la incubación, las células se lisaron a 4 °C durante 40 min con el buffer de lisis compuesto de 50 mM Tris-HCl, pH 7,5, conteniendo 1% NP-40, 0,2% Triton

X-100, 150 mM NaCl, e inhibidores de fosfatasa y proteasas. Los extractos celulares se centrifugaron a 2.500 g durante 10 min para descartar núcleos y restos celulares. Los sobrenadantes se preclarearon con proteína G – sefarosa a 4°C durante toda la noche e inmunoprecipitaron con los anticuerpos anti-p74 o anti-p150-glued durante 4 h a 4°C. La proteína G – sefarosa se añadió durante 20 min a 4°C. Los inmunoprecipitados se lavaron hasta seis veces con el buffer de lisis y se procesaron posteriormente por WB.

5.3.- Determinación de la producción de citoquinas: ELISA.

Para estudiar la producción de IL-2 por parte de los linfocitos T tras activación, se formaron conjugados como se ha descrito anteriormente y se cultivaron en una placa P96. El sobrenadante tras 16 h de incubación a 37°C se recogió y se analizó la concentración de IL-2 mediante ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) (Diacclone).

5.4.- Citometría de flujo.

Inicialmente, las células se incubaron con TBS- γ -globulina para bloquear los receptores de Fc. Posteriormente, se tiñeron durante 30 min en hielo con anticuerpos conjugados a ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC) o aloficocianina (APC) o con anticuerpos biotinilados seguidos de estreptavidina conjugada a PE o APC. Finalmente, las células se lavaron y se analizaron con un citómetro de flujo FACSCalibur (Becton Dickinson). En los ensayos se adquirieron más de 10.000 eventos por condición y se analizaron utilizando el programa CellQuestPro 4.0.2 de BD.

Para los experimentos de tinción intracelular de citoquinas, las células se lavaron extensivamente con PBS y se estimularon durante 4 h con 50 ng/ml de PMA y con 750 ng/ml de ionomicina más brefeldina A a 1 μ g/ml (todos de Sigma-Aldrich). Posteriormente, las células se fijaron con paraformaldehído al 2%, se permeabilizaron con saponina al 0.5%, se tiñeron con el anticuerpo contra IL-2 (BD Pharmingen) y se analizaron por citometría de flujo.

RESULTADOS

1.- PAPEL DEL COMPLEJO MOTOR DINEÍNA/DINACTINA EN LA TRANSLOCACIÓN DEL MTOC Y LA ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T.

El complejo dineína/dinactina se ha implicado en el posicionamiento del MTOC y del citoesqueleto de tubulina durante la migración de fibroblastos y células epiteliales (Palazzo et al., 2001). Sin embargo, el papel regulador que puede desempeñar en el movimiento del MTOC en linfocitos T durante la formación de la SI no ha sido estudiado.

1.1.- Los distintos componentes del complejo motor dineína/dinactina localizan en la zona de contacto T-APC.

Para estudiar los mecanismos moleculares que reordenan el citoesqueleto de tubulina y translocan el MTOC a la SI, inicialmente se determinó la localización de los diferentes componentes del complejo dineína/dinactina en los conjugados formados entre la célula T y su correspondiente APC. Por un lado, se utilizaron células T Jurkat J77 conjugadas con células Raji cargadas con el antígeno SEE (**Figura 8A**), y por otro, células T CH7C17 conjugadas con células Hom2 cargadas con el péptido HA (**Figura 8B**). Como podemos observar en las imágenes de microscopía confocal, la subunidad p74 de dineína se encontraba principalmente en aquellas estructuras relacionadas con el citoesqueleto de tubulina, al igual que ocurre con la subunidad p50-dinamitina (Echeverri et al., 1996) y p150^{glued}, subunidad que media la interacción entre dinactina y dineína (Vaughan and Vallee, 1995). En la mayoría de los conjugados T-APC, el MTOC se encontraba en el contacto entre ambas células. Las distintas subunidades del complejo dineína/dinactina (p150, p50, p74) se detectaron en el MTOC localizado en la SI y en el citoesqueleto de tubulina próximo a la zona de contacto, que corresponde con la periferia de la SI, como se observa en las reconstrucciones 3D obtenidas por microscopía confocal.

Para averiguar si el complejo dineína/dinactina está funcionalmente implicado en la reorientación del MTOC, se generaron diferentes clones de células T Jurkat que expresaban la subunidad p50-dinamitina acoplada a GFP. Se obtuvieron 4 clones diferentes, de comportamiento similar y, por tanto, se utilizaron indistintamente en los experimentos posteriores. Mediante inmunoprecipitación de la subunidad p150 a distintos tiempos de interacción T-APC, se encontró que la unión de la subunidad p74 de dineína a p150^{glued} en linfocitos T cambiaba rápidamente tras la activación del TCR (**Figura 9**). Se pudo observar un descenso en la interacción a tiempos cortos (0-2 min), recuperada posteriormente en tiempos posteriores (5-20 min). La subunidad p50 acoplada a GFP ejercía un papel inhibitorio en la formación del complejo dineína/dinactina previniendo la interacción de la subunidad

p74 con la subunidad p150^{glued}, como anteriormente se había descrito en otros sistemas (Melkonian et al., 2007) (**Figura 9**).

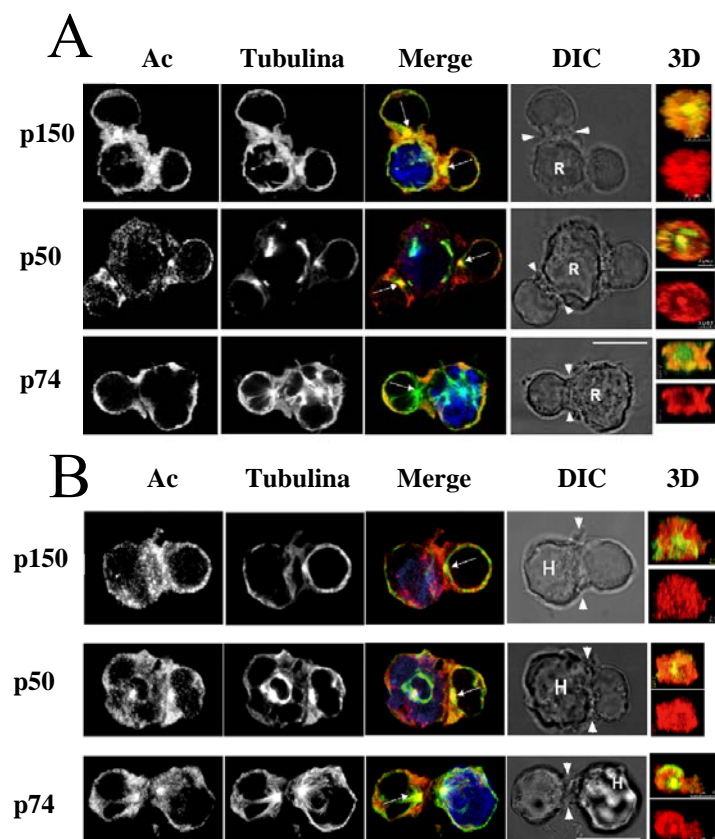


Figura 8: Localización de los distintos componentes del complejo dineína/dinactina en la SI. (A, B) Los conjugados J77/SEE-Raji (A) y CH7C17/HA-Hom2 (B) se procesaron y los distintos componentes del complejo se detectaron mediante anticuerpos específicos (Ab; α -p150, p150-glued; α -p50, p50-dinamitina; α -p74, p74 cadena intermedia de dineína, clon 74.1). La α -tubulina se detectó mediante el uso de un anticuerpo marcado con FITC. Las imágenes de confocal y las correspondientes reconstrucciones en 3D de la SI se muestran (las flechas en las imágenes DIC marcan la unión célula-célula escogida para realizar la proyección 3D). Las barras equivalen a 10 μ m.

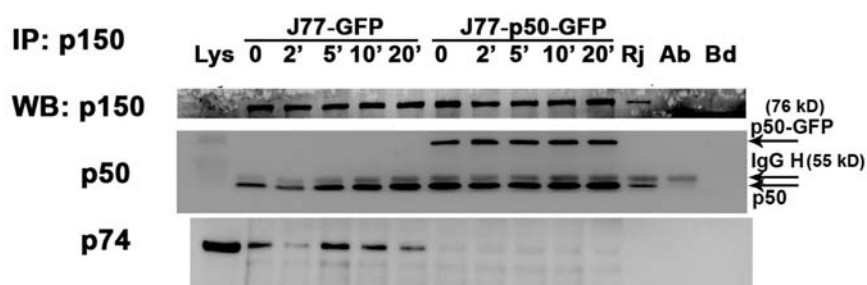


Figura 9: Comportamiento del complejo motor dineína/dinactina tras activación del TCR. La subunidad p150^{glued} se inmunoprecipitó (IP) en células T J77 que sobreexpresaban GFP (J77-GFP) o p50-dinamitina-GFP (J77-p50-GFP), no estimuladas o estimuladas por Raji en presencia de SEE (0,3 μ g/ml) a los tiempos indicados. Los puntos se procesaron mediante WB usando los anticuerpos indicados. Las flechas indican la posición de la subunidad p50 endógena (50 kD) o la acoplada a GFP (76 kD), e IgG H (55 kD). Ab, anticuerpo de inmunoprecipitación; Bd, esferas de agarosa acopladas a proteína; Lys, lisado total; Rj, células Raji.

1.2.- La inhibición de la actividad del complejo motor dineína/dinactina impide la correcta translocación del MTOC a la sinapsis inmune.

Una vez descritos los componentes del complejo dineína/dinactina en el contexto de la SI, se estudió el comportamiento del MTOC en los clones que expresan la subunidad p50-

GFP conjugados con células Raji en presencia de SEE. En los cuatro clones utilizados, la translocación del MTOC a la zona de contacto T-APC fue defectiva (**Figura 10A**). Este fallo podría deberse bien a un fallo en la localización del MTOC o bien por un defecto en el anclaje del mismo una vez llega a la SI. Para distinguir entre ambas posibilidades, se estudió el movimiento del MTOC en células J77 mediante vídeo-microscopía confocal, desde el inicio del contacto con la APC. El movimiento del MTOC en las células J77 que expresaban p50-GFP no era evidente, mostrando un defecto en la translocación del mismo a la SI (**Figura 10B, M2**). Sin embargo, en las células J77 control, que sobreexpresan la proteína paxilina acoplada a GFP (Herreros et al., 2000), el MTOC se localizaba en el área de contacto ya en los primeros 2-5 min (**Figura 10B, M1**). Estos datos refuerzan el papel del complejo dinactina en la translocación del MTOC, en cooperación con dineína.

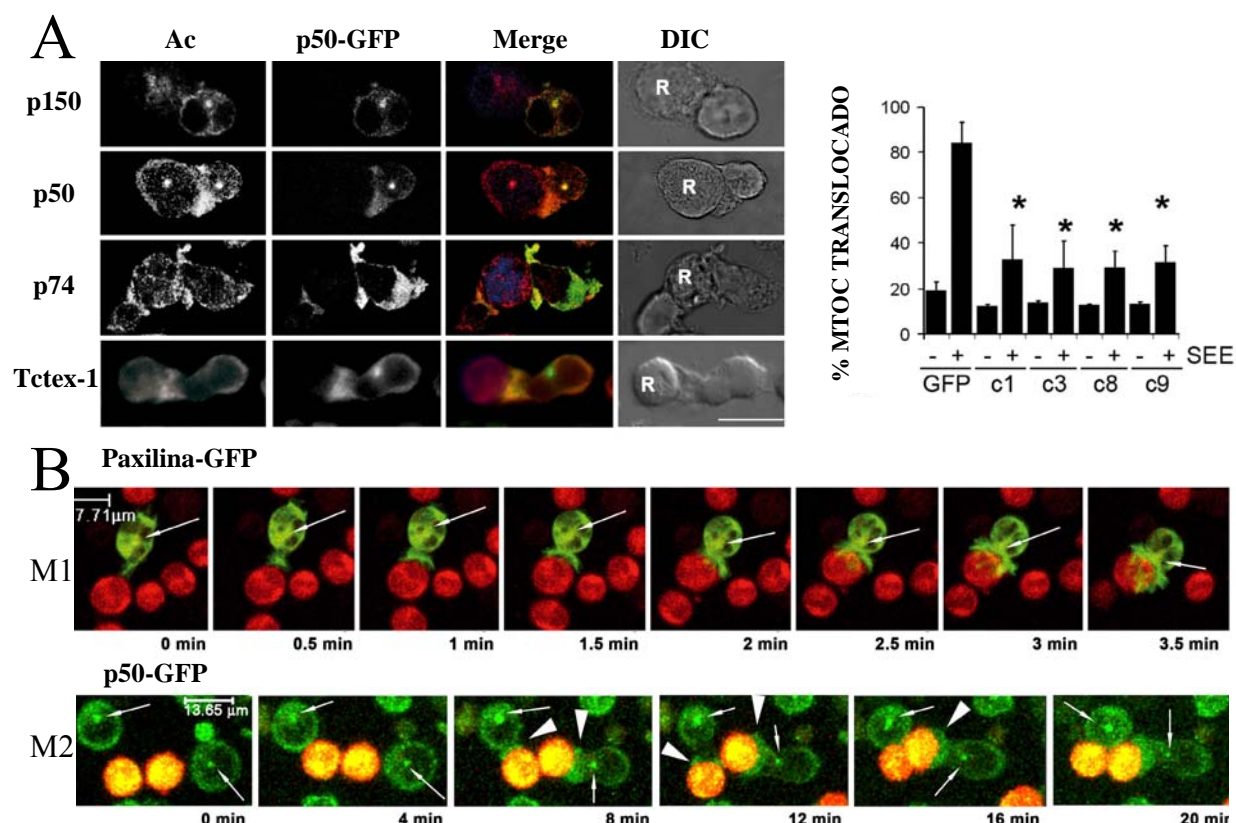


Figura 10: La sobreexpresión de p50-dinamitina-GFP impide la translocación correcta del MTOC a la SI. (A) Los componentes del complejo dineína/dinactina se localizan en la SI de las células que sobreexpresan p50-GFP. Los conjugados formados entre los distintos clones de células J77 y células Raji se procesaron como en la figura 8. En la parte derecha se muestra la cuantificación de la translocación del MTOC en los distintos clones p50-GFP (c1, c3, c8 y c9) y el control GFP. Un total de 600 conjugados se contabilizaron de 5 experimentos independientes. Los resultados son la media aritmética \pm SD; * indican $P < 0.05$ comparado con células J77 control GFP (Test de la t de Student). (B) Las células J77 que expresan paxilina (M1) o p50-GFP (M2) se incubaron con células Raji en presencia de SEE (0,5 μ g/ml) y se marcaron con CMTMR (roja); se muestran distintas secuencias tomadas mediante vídeo-microscopía confocal a los tiempos indicados. Las imágenes fueron capturadas a 37°C. Las flechas indican la posición del MTOC. M, *movie* (película).

1.3.- La depleción de dineína previene la translocación del MTOC.

Para estudiar más a fondo el papel del complejo dineína/dinactina en el movimiento del MTOC, se impidió la formación del mismo mediante la reducción de la expresión de la cadena pesada de dineína (DHC: 530 KDa). En estos experimentos, tanto las células T J77 como CH7C17 se transfectaron con una combinación de oligonucleótidos específicos para DHC (ver Materiales y Métodos). En ambos tipos celulares, la expresión de DHC se redujo en torno a un 70% con respecto a los controles (**Figura 11, A-B**). En las células J77 control, DHC se acumulaba en la SI alrededor del MTOC translocado; en torno al 80-85% de éstas células translocaban correctamente el MTOC. Sin embargo, en las células interferidas para DHC, solamente el 35% mostraban el MTOC translocado correctamente suponiendo una inhibición superior al 50% (**Figura 11A**). En el caso de las células CH7C17, la proporción de células que translocaban el MTOC a la zona de contacto T-APC (tanto en presencia de SEB como HA) era, respectivamente, del 23,4% y 23,6% comparado con los correspondientes controles, 85,8% y 84,4% (**Figura 11B**). Estos datos, junto con los obtenidos en los clones que expresan p50-GFP, nos permiten afirmar que la actividad del complejo dineína/dinactina desempeña un papel fundamental en la translocación del MTOC a la SI.

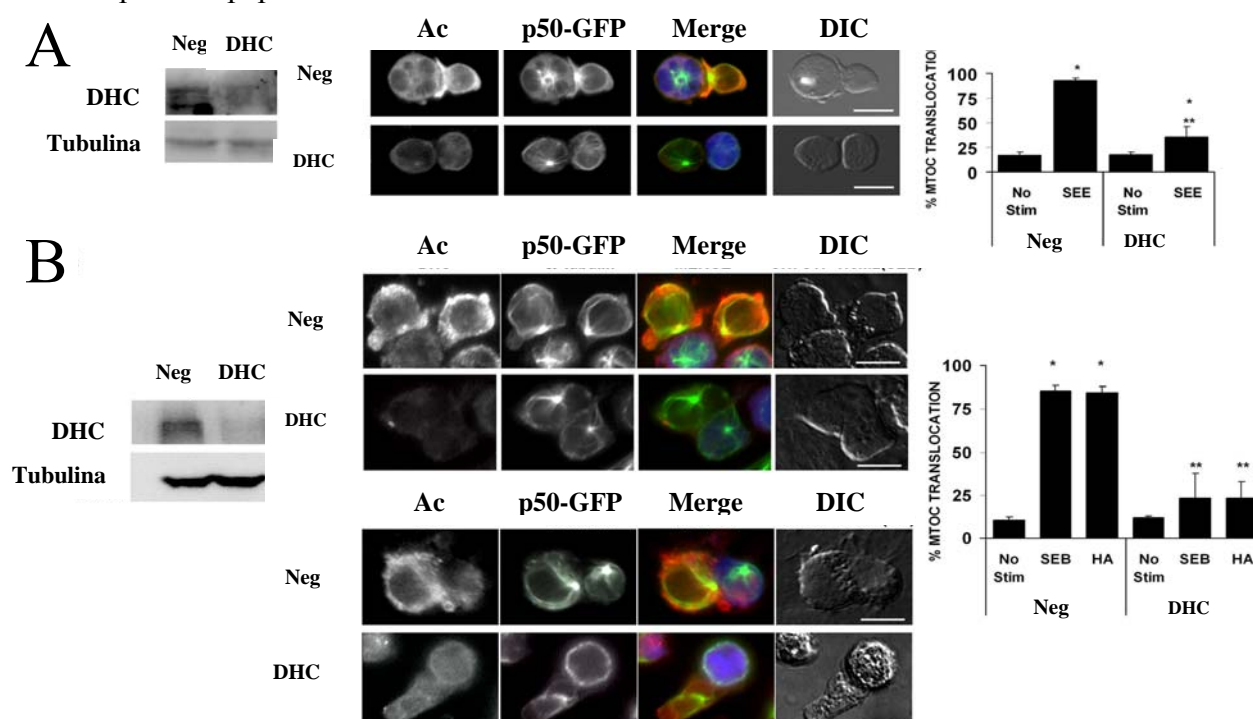


Figura 11: La interferencia de la cadena pesada de dineína previene la translocación del MTOC. (A, B) J77 (A) y CH7C17 (B). **Panel izquierdo**, se muestra el efecto del silenciamiento de DHC, detectada mediante WB con anti-DHC. La tubulina se utilizó como control de carga. **Panel central**, las células T se transfectaron con siRNA control (Neg) o siRNA para DHC, y los conjugados se formaron como en la figura 8. La barra equivale a 10 μ m. **Panel derecho**, se muestra la cuantificación de la translocación del MTOC al igual que en la figura 10. Se contaron más de 200 conjugados por condición. Los resultados son la media aritmética \pm SD; * indican $P < 0.05$ comparado con no estimulación; **, $P < 0.001$ respecto a siNeg (Test de la t de Student).

1.4.- La sobreexpresión de p50-dinamitina-GFP altera la organización de la sinapsis inmune.

Para profundizar aún más en los efectos observados al alterar el complejo dineína/dinactina en el contexto de la SI, se examinó el posible efecto que tenía en la organización de los SMACs. Con este propósito, se analizó mediante inmunofluorescencia la localización de CD3 y LFA-1 en los clones p50-GFP para así determinar la arquitectura del c- y p-SMAC, respectivamente. Sin embargo, aunque se observaba tanto el acúmulo de CD3 como de LFA-1 en la zona de contacto con la APC, las reconstrucciones 3D revelaron que la integrina LFA-1 no se encontraba desplazada del todo del c-SMAC en los clones, a diferencia de las células control donde se observaba el anillo característico que forma la integrina en el p-SMAC (**Figura 12A**). Sin embargo, resultó más interesante observar como CD3 no se encontraba en un único agregado central (como sí ocurre en los controles) sino en pequeños agregados dispersos por todo el área de contacto (**Figura 12, A-B**). Para poder cuantificar esta distribución irregular, se analizó el área que ocupaba CD3 en la SI observándose que esta distribución se acompañaba de un incremento en el área de distribución de CD3 (**Figura 12C**). Esta distribución anómala puede provocar un efecto negativo en la distribución posterior de numerosos efectores en la SI.

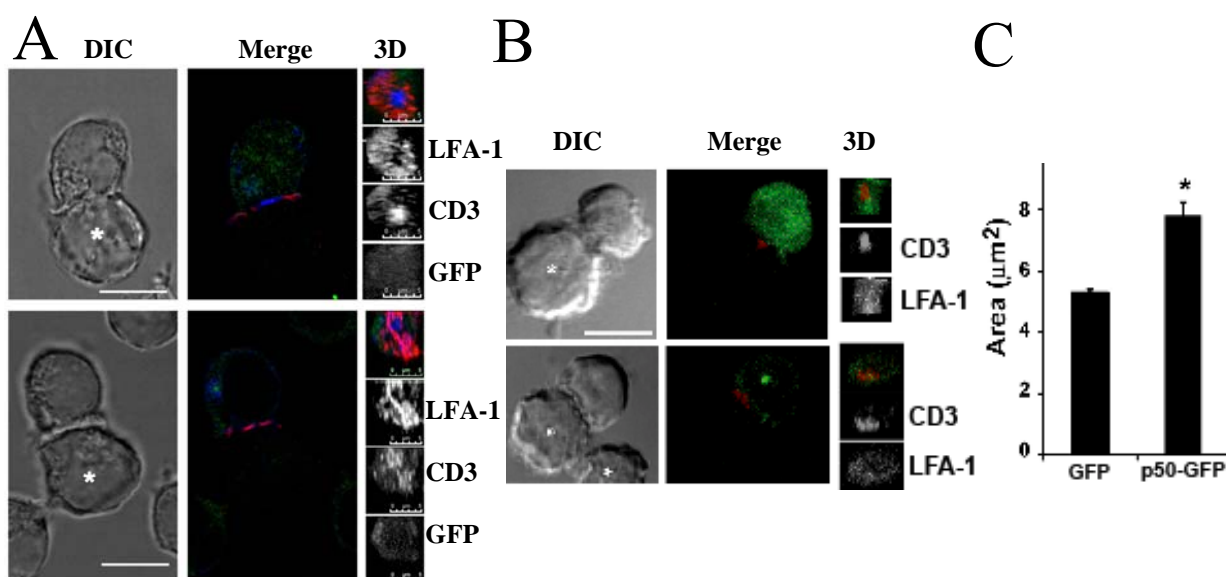


Figura 12: La pérdida de función del complejo dineína/dinactina altera la configuración de la SI. (A) Tanto LFA-1 como CD3 muestran una correcta arquitectura en las células control GFP pero no en las que sobreexpresan p50-GFP. Los conjugados se formaron como en la figura 8. Se muestran las imágenes de confocal y las correspondientes reconstrucciones en 3D de la SI (derecha). El asterisco en la imagen DIC representa la célula presentadora Raji. La barra equivale a 10 μm . **(B)** Detección de CD3 en clones GFP y p50-GFP mediante T3b (rojo). **(C)** La gráfica muestra el análisis cuantitativo del área que corresponde a la tinción de CD3 en la SI. Los datos son la media aritmética \pm SEM; * indican $P < 0.05$ comparado con las células GFP control (Test de la t de Student). Se contaron más de 20 conjugados por condición.

1.5.- La señalización intracelular desencadenada tras activación del TCR se encuentra alterada tras la inhibición de la actividad del complejo motor dineína/dinactina.

Los resultados obtenidos anteriormente nos indicaban un fallo a nivel de organización de la SI y, por ello, se decidió estudiar el efecto que podría tener la inhibición de la actividad de dineína en las diferentes rutas de señalización. Para ello, se estudió el estado de fosforilación de distintas moléculas de señalización de la ruta del TCR a distintos tiempos de activación, tales como ZAP70, LAT, VAV1, PKC θ y ERK1/2, moléculas importantes en la activación del linfocito. Como se puede observar en los WB, la fosforilación de ZAP70 era mucho menor en los clones que expresaban p50-dinamitina-GFP con respecto al control (**Figura 13A**). A su vez, ZAP70 fosforila a LAT en su tirosina 191 (Y191) (Paz et al., 2001), siendo este evento necesario para activar a LAT, que actúa como proteína adaptadora desde la cual confluyen diferentes rutas de señalización. Analizando la fosforilación en la Y191 de LAT en los clones p50-GFP, se observó que dicha fosforilación no se mantenía a tiempos prolongados (a partir de 1 min tras la activación del TCR) (**Figura 13B**). En concordancia con este dato, VAV1, que se asocia a LAT a través de la tirosina mencionada anteriormente (Paz et al., 2001), mostraba una fosforilación reducida en su tirosina 174 (**Figura 13C**), lo cual sugiere que la actividad de VAV podría estar afectada en los clones (Lopez-Lago et al., 2000). Aparte de la Y191, LAT posee numerosos residuos potenciales de ser fosforilados que actúan como puntos de anclaje de otras proteínas señalizadoras (Paz et al., 2001). Se analizó la fosforilación de las tirosinas 132, 171 y 226, y se comprobó también un menor grado de fosforilación en los clones (**Figura 13B**), observándose a tiempos cortos una fosforilación que posteriormente se detenía (5 min). Estos datos sugieren que la fosforilación sostenida inducida tras la activación del TCR (Houtman et al., 2005) se encontraba alterada, ya incluso desde el inicio mediante el fallo en la activación de moléculas tan importantes como ZAP70 y LAT. Estos fallos podrían afectar a las proteínas señalizadoras que se encuentran por debajo de LAT, como es el caso de VAV1; sin embargo, otras moléculas, tales como PKC θ y ERK1/2 (**Figura 13, D-E**), se fosforilan mucho más rápido en los clones que expresan p50-GFP con respecto a los controles GFP.

Para investigar más a fondo el papel del complejo dineína/dinactina en la activación de la célula T, se interfirió de nuevo la cadena pesada de dineína (DHC) en las células T J77 y se estudió la señalización derivada de la activación del TCR. Al igual que ocurría con los clones de p50-dinamitina-GFP, se observaba una clara reducción en los niveles de fosforilación de ZAP70 (Y315), LAT (Y132, Y191) y VAV1 (Y174) (**Figura 14A**). Además, la fosforilación de PLC γ 1 en la tirosina 783 (Y783) también se encontraba disminuida. Se obtuvieron

resultados similares cuando interferimos DHC en las células T CH7C17 conjugadas con las células Hom2 en presencia del péptido HA (**Figura 14B**). En contraste, la fosforilación de PKC θ (T538) y ERK1/2 no estaba afectada, incluso algo acentuada en las células interferidas para DHC con respecto a las células control, correlacionando con lo observado anteriormente en las células T que expresaban p50-dinamitina-GFP.

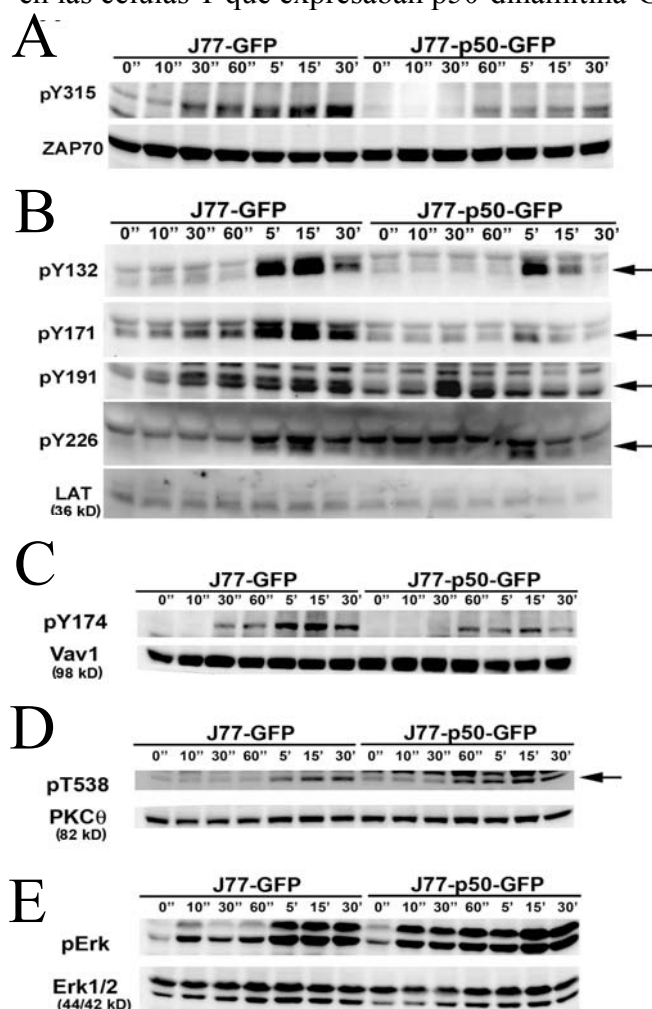


Figura 13: La sobreexpresión de p50-dinamitina-GFP impide la señalización sostenida tras activación del TCR. (A – E) Los diferentes WB muestran el grado de fosforilación de diferentes moléculas de señalización en J77 control (J77-GFP) o J77-p50-GFP tras estimulación con Raji cargadas con SEE (0,5 μ g/ml) a los tiempos indicados. Los extractos totales se procesaron tanto para las formas fosforiladas como la proteína total, utilizada como control de carga. El orden es el siguiente: (A) ZAP70 pY315 y ZAP70 total; (B) LAT pY132, pY171, pY191, pY226 y LAT total; (C) Vav1 pY174 y Vav1 total; (D) PKC θ pT538 y PKC θ total; y (E) Erk1/2 fosforilada y total. Se muestra uno de cuatro experimentos representativos. Las flechas indican la banda correspondiente a la proteína de estudio.

1.6.- La inhibición de la translocación del MTOC impide la llegada a la SI de compartimentos intracelulares donde se acumulan moléculas señalizadoras.

Algunas moléculas de señalización, como es el caso de LAT, se acumulan en la SI tras la activación del TCR (Blanchard et al., 2002; Bonello et al., 2004). Como se observa en las imágenes de inmunofluorescencia, LAT se concentra en la zona de contacto de las células T control transfectadas con GFP (**Figura 15A**). Sin embargo, en los clones p50-GFP la fracción de LAT asociada a compartimentos intracelulares se encuentra circundante al MTOC, y por tanto, alejada de la SI (**Figura 15A**). Por ello, esta fracción de LAT no podría contribuir a la maduración de la SI ya que el MTOC se encuentra deslocalizado de la misma. También se analizó el nivel de VAV1 fosforilado presente en la SI, observándose cierta señal en los conjugados de clones p50- GFP con Raji cargadas con SEE, que es mucho menor que

en el caso de los controles GFP (**Figura 15B**), consistente con el bajo nivel de fosforilación detectado mediante WB en las cinéticas de fosforilación de los clones.

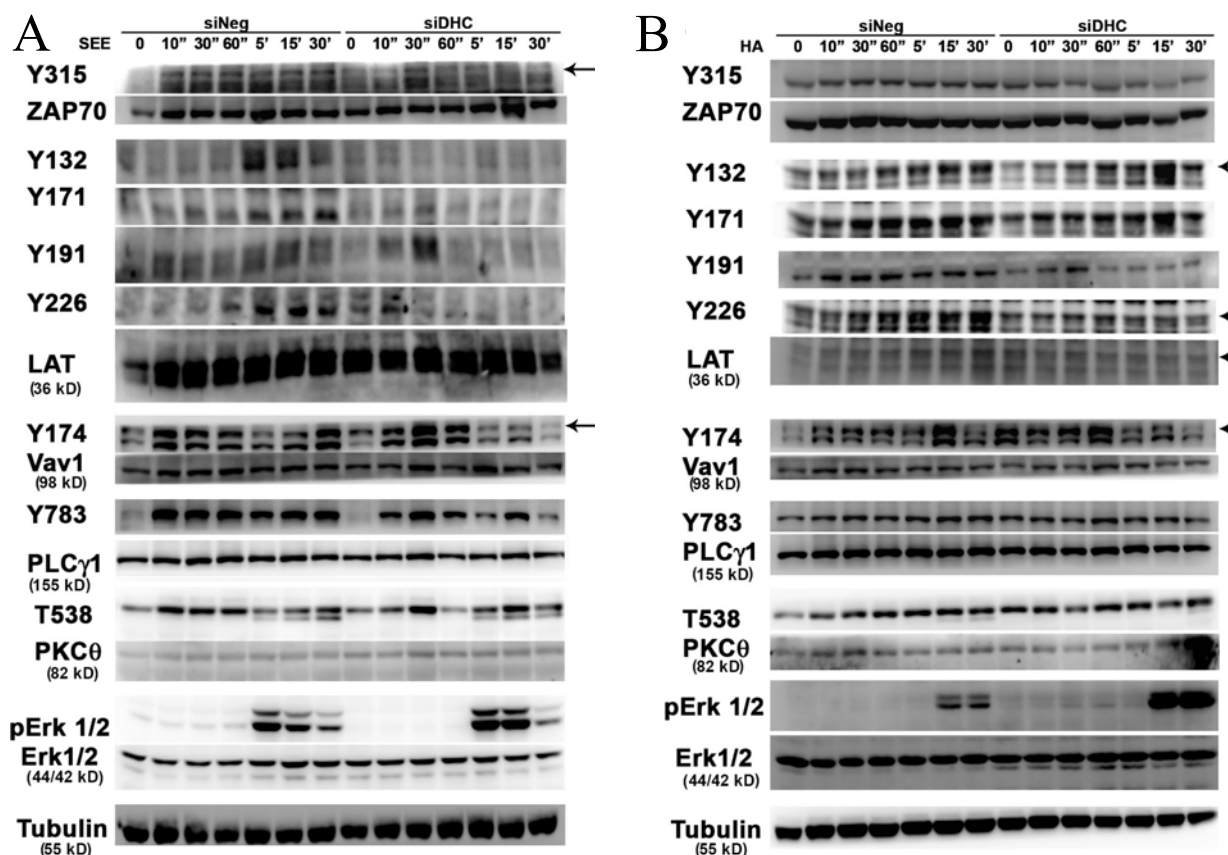


Figura 14: La señalización derivada de la activación del TCR se encuentra alterada por el silenciamiento de DHC. (A, B) Los diferentes WB muestran el grado de fosforilación de diferentes moléculas de señalización como en la figura 13. Los pares T-APC analizados fueron J77/SEE-Raji (A) y CH7C17/HA-Hom2 (B). pY783 PLCγ1, PLCγ1 fosforilada en Y783. Se muestra uno de cuatro experimentos representativos. La tubulina se utiliza como control de carga. Las flechas indican la banda correspondiente a la proteína de estudio.

1.7.- La producción de IL-2 se inhibe por la sobreexpresión de p50-dinamitina-GFP y el silenciamiento de dineína.

El fallo observado en la translocación del MTOC se puede examinar mediante diferentes parámetros que definen una activación completa del linfocito T. La liberación de IL-2 es uno de los eventos iniciales que tienen lugar (Huse et al., 2006), además de la expresión en superficie de CD69, considerado un marcador de activación temprana (Corte et al., 1981). En los conjugados formados entre células T J77 que expresaban p50-GFP con células Raji, la expresión de CD69 no se alteró con respecto a los controles (**Figura 16A**). Sin embargo, la producción de IL-2 fue mucho menor, medida tanto en sobrenadantes de cocultivos T-APC mediante ELISA como IL-2 intracelular cuantificada mediante citometría de flujo (**Figura 16, B-C**). También se detectó un menor nivel de IL-2 en las células J77

interferidas para DHC (**Figura 16D**), correlacionando con el evidente fallo en la translocación del MTOC.

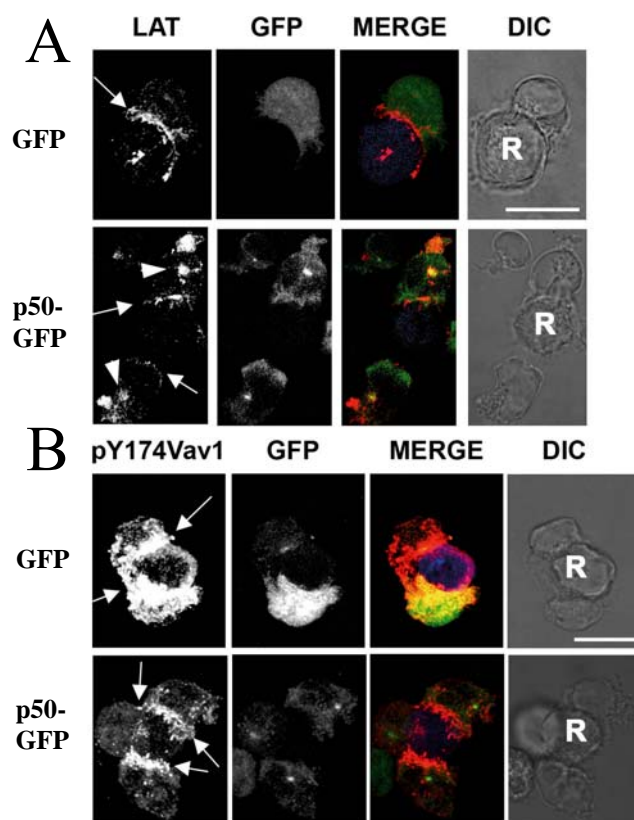


Figura 15: La sobreexpresión de p50-dinamitina-GFP impide la llegada de compartimentos con moléculas de señalización a la SI. Los conjugados se formaron como en la figura 8 y se marcaron para proteínas implicadas en la maduración de la SI (rojo), en este caso LAT (**A**) y fosfo-VAV1 (pVAV1-Y174) (**B**). Las flechas en las imágenes correspondientes indican la zona de contacto T-APC. R, Raji cargadas con CMAC. Las barras equivalen a 10 μ m.

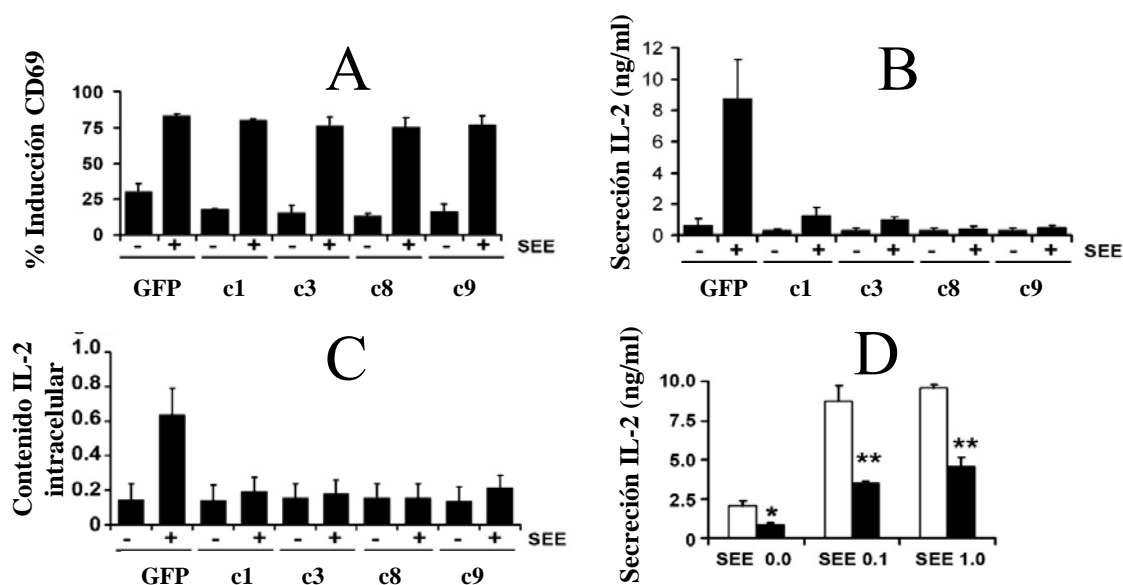


Figura 16. La producción de IL-2 se altera por la sobreexpresión de p50-dinamitina-GFP y el silenciamiento de DHC. (**A**) La inducción de CD69 se detectó por FACS en los clones que sobreexpresan GFP y p50-GFP, conjugadas con células Raji en ausencia o presencia de SEE (0,5 μ g/ml) durante 16 horas (se muestra el porcentaje de células). Tres experimentos se realizaron por triplicado. (**B - D**) La secreción de IL-2 se detectó mediante ELISA en los sobrenadantes recogidos anteriormente; en el caso de las células interferidas para DHC se midió la producción de IL-2 a diferentes concentraciones (μ g/ml). Además, se midieron los niveles de IL-2 intracelular mediante FACS. Los datos son la media aritmética \pm SD de tres experimentos realizados por triplicado. * indican $P < 0.05$ y ** indica $P < 0.001$ (Test de la t de Student).

2.- PAPEL DE LA PROTEÍNA ADAPTADORA AKAP450 EN LA ORGANIZACIÓN DE LA SINAPSIS INMUNE Y LA ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T.

La relación existente entre la proteína adaptadora AKAP450 y la funcionalidad del complejo MTOC/aparato de Golgi (Keryer et al., 2003; Rivero et al., 2009) descrita en la introducción nos hizo pensar que podría tratarse de una molécula que desempeñara un papel importante en la activación linfocitaria mediante la regulación de este complejo. Además, la conexión descrita entre AKAP450 y la integrina LFA-1 (El Din El Homasany et al., 2005) en la migración linfocitaria nos planteaba la hipótesis de si AKAP450 mediante LFA-1 podría jugar un papel fundamental en la correcta organización de la SI.

2.1.- La proteína AKAP450 y la organización del p-SMAC en la sinapsis inmune.

Con el objetivo de estudiar el papel que desempeña AKAP450 en la organización de los SMACs, inicialmente se sobreexpresó una forma dominante negativa para AKAP450. Dicha construcción, denominada C-term AKAP450-GFP, contiene el dominio carboxi-terminal de AKAP450 por el cual se asocia al MTOC. Se ha descrito anteriormente que la sobreexpresión de este mutante desplaza a la proteína endógena de su posición natural en la célula (Keryer et al., 2003). Inicialmente, se estudió el posible efecto que podría tener la sobreexpresión de dicha construcción en el comportamiento normal del linfocito T. Para ello se sobreexpresó C-term AKAP450-GFP en células T J77 y se realizaron diferentes experimentos control (**Figura 17**). Se observó mediante WB que los niveles de la proteína endógena no se alteraban (**Figura 17A**) y que los linfocitos T tenían un ciclo celular normal (**Figura 17B**), descartando que la sobreexpresión de la construcción mutante afectara a la funcionalidad de la célula J77. Además, se comprobó que la construcción mutante acoplada a GFP se localizaba en el centrosoma del linfocito (**Figura 17C**).

La formación y maduración de la SI involucra el posicionamiento de las moléculas CD3 y LFA-1 en el c- y p-SMAC, respectivamente (Monks et al., 1998). Mediante microscopía confocal se observó que CD3 se localizaba aparentemente en la zona central de la SI tanto de las células control GFP como aquellas que sobreexpresaban C-term AKAP450-GFP (**Figura 18A**). Sin embargo, el análisis de la integrina LFA-1 reflejó que no se encontraba totalmente separada del c-SMAC, confirmado posteriormente en las reconstrucciones 3D donde se puede observar que el anillo que forma LFA-1 en el p-SMAC era irregular y anómalo (**Figura 18A**). Los histogramas de fluorescencia confirmaron que la señal de la integrina LFA-1 se superponía con la de CD3 en el c-SMAC, sugiriendo que AKAP450 funcionalmente podría ser necesaria para la segregación correcta de LFA-1 en la SI (**Figura 18B**). La cuantificación

de estos experimentos muestra como la mayoría de las células que sobreexpresan C-term AKAP450-GFP presentan una configuración alterada de LFA-1 en la SI (**Figura 18C**).

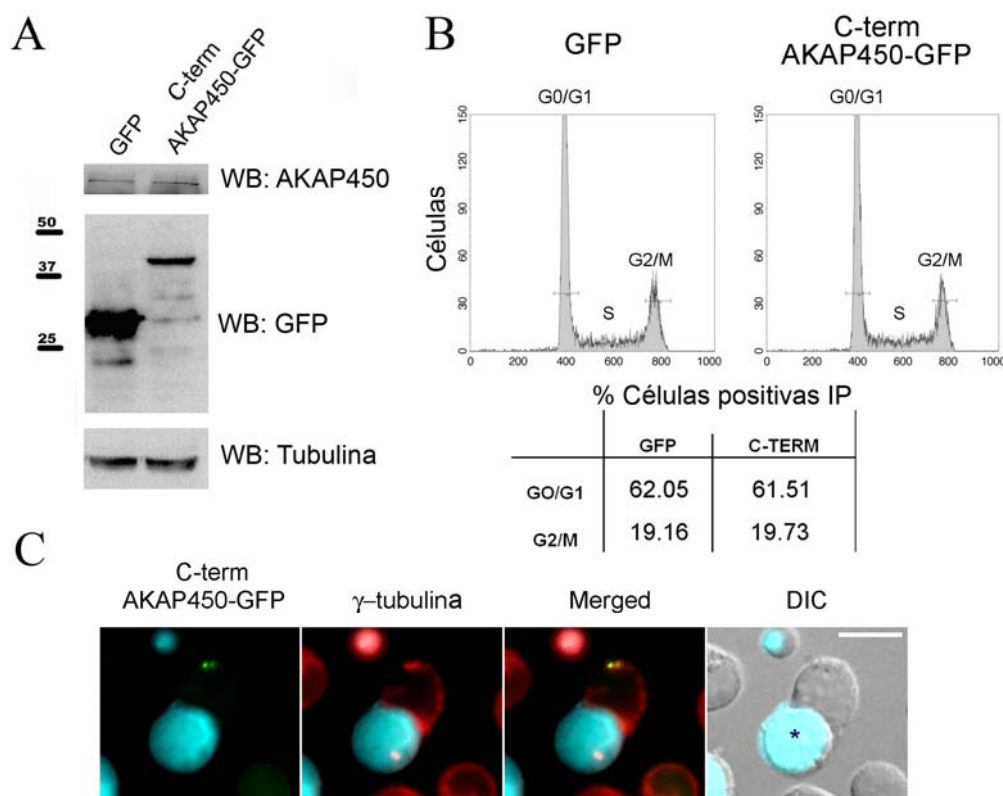


Figura 17: Expresión de la forma mutante de AKAP450 en las células T. (A) Células J77 se transfectaron con las construcciones que codifican para GFP y C-term AKAP450-GFP, y la expresión de la proteína endógena. GFP y tubulina se detectó mediante WB. (B) Se muestran los perfiles de ciclo celular (mediante el uso de ioduro de propicio, ver Materiales y Métodos) representando el contenido en DNA de las células GFP y C-term AKAP450-GFP. Los picos corresponden a las fases G0/G1 y G2/M, respectivamente. El area entre los picos indica las células en fase S. La distribución del contenido en DNA se cuantificó y se representa en la tabla. (C) Las células J77 que sobreexpresaban C-term AKAP450-GFP se conjugaron con células Raji en presencia de SEE, y se marcaron para γ -tubulina (rojo). Los asteriscos indican las células Raji marcadas con la sonda CMAC. Las barras equivalen a 10 μ m.

Para confirmar estos resultados, se decidió estudiar el efecto del dominante negativo de AKAP450 en la SI que forman las células primarias humanas. Para ello, se obtuvieron linfoblastos T derivados de sangre periférica capaces de reconocer el antígeno SEE presentado por células Raji (ver Materiales y Métodos), para posteriormente formar conjugados T-APC igual de funcionales que los formados por células Jurkat. Tras sobreexpresar C-term AKAP450-GFP en los linfoblastos T humanos mediante nucleofección, se conjugaron con células Raji en presencia de SEE y se observó un patrón alterado de la integrina LFA-1 en la SI formada, confirmando los datos obtenidos con las células T J77 (la cuantificación de dicho efecto se presenta en la figura) (**Figura 19**).

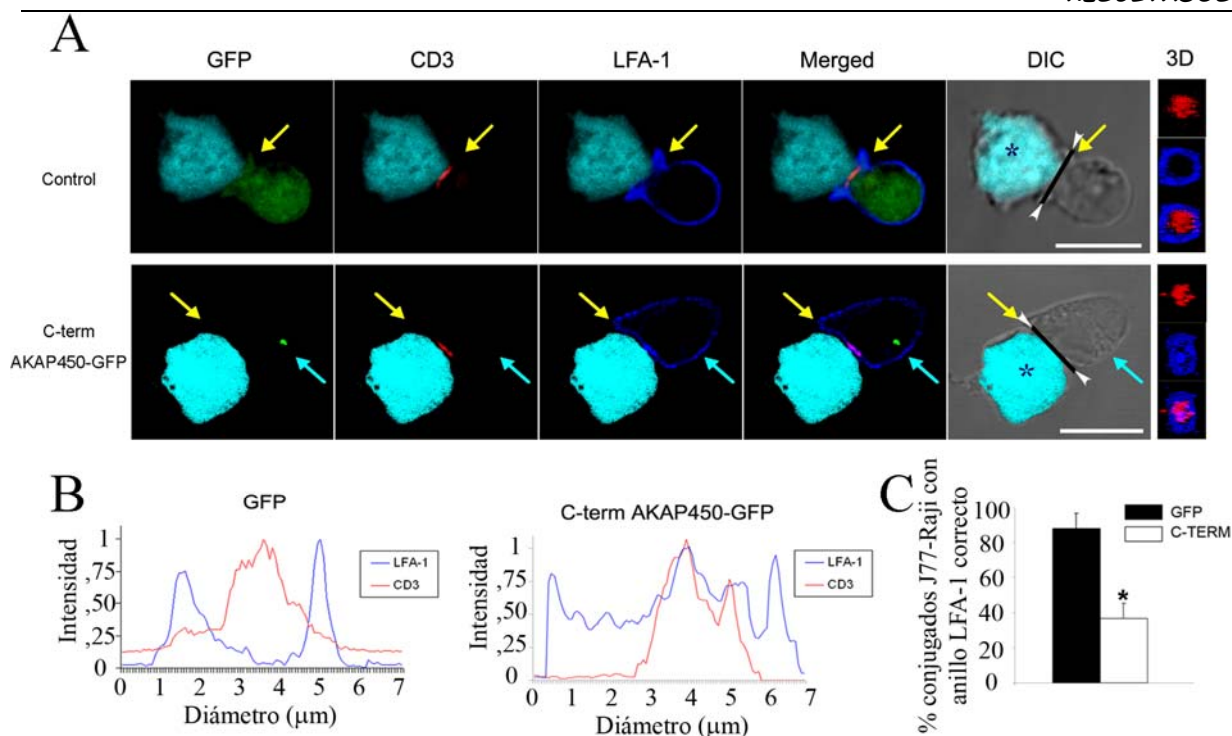


Figura 18: La proteína AKAP450 se requiere para la correcta organización de la integrina LFA-1 en la SI. (A) Las células J77 que expresaban GFP o C-term AKAP450-GFP se incubaron con células Raji en presencia de SEE (0,5 μg/ml) y la tinción se realizó con anticuerpos para LFA-1 (azul) y CD3ζ (rojo). Se muestran las imágenes de confocal y las correspondientes reconstrucciones en 3D de la SI (las flechas en las imágenes DIC marcan la unión célula-célula escogida para realizar la proyección 3D). Las flechas amarillas indican la posición de la SI y las azules la posición del MTOC deslocalizado. Los asteriscos indican las células Raji marcadas con la sonda CMAC. Las barras equivalen a 10 μm. (B) Los histogramas muestran los perfiles de intensidad de fluorescencia tanto para la tinción de CD3 (rojo) como LFA-1 (azul) a lo largo de las líneas negras que marcan el contacto T-APC en las imágenes DIC. (C) Las gráficas muestran la cuantificación del número de conjugados T-APC que presentan una organización correcta de la integrina LFA-1 en la SI. Los valores representan la media aritmética de diferentes experimentos donde se han contado más de 50 conjugados y normalizados con respecto al control GFP +/- SD. * indica $P < 0.05$ (Test de la t de Student).

Posteriormente, se estudió si el patrón alterado observado para LFA-1 cuando se afectaba a la funcionalidad de AKAP450 era exclusivo, o bien se podría generalizar a otras moléculas acumuladas en la parte periférica de la SI, implicando a AKAP450 en un papel más general en la configuración del p-SMAC. Para ello, se decidió estudiar el comportamiento de otras moléculas que segregan en el p-SMAC. Una de estas moléculas es la integrina beta1 (VLA-4), la cual está enriquecida en la zona de contacto entre las células (Mittelbrunn et al., 2004); sin embargo, las reconstrucciones 3D revelaron que no se segregaba correctamente en el p-SMAC cuando se sobreexpresaba C-term AKAP450-GFP (**Figura 20A**). Por otro lado, otras moléculas como ADAP se encontraban bien organizadas en el p-SMAC (**Figura 20B**). Estas observaciones requieren un análisis más profundo para así clarificar el papel de AKAP450 en la segregación de las diferentes moléculas de adhesión presentes en el p-SMAC.

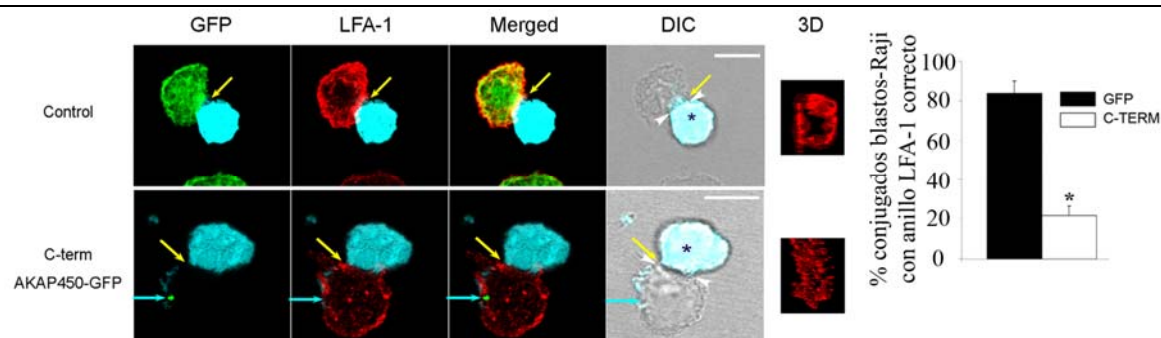


Figura 19: La segregación de LFA-1 se impide en linfoblastos T cuando se sobreexpresa C-term AKAP450-GFP. Los linfoblastos T primarios que expresaban GFP o C-term AKAP450-GFP se incubaron con células Raji en presencia de SEE (0,5 μ g/ml) y se marcaron para LFA-1 (rojo). Las imágenes de confocal y las reconstrucciones 3D se procesaron como en la figura 18. Las flechas y los asteriscos son como en la figura 18. Las barras equivalen a 10 μ m. La gráfica muestra la cuantificación de las SI que presentan una arquitectura correcta del anillo de LFA-1. Los valores representan la media aritmética de 30 conjugados, normalizados con respecto al control GFP +/- SD. * indica $P < 0.05$.

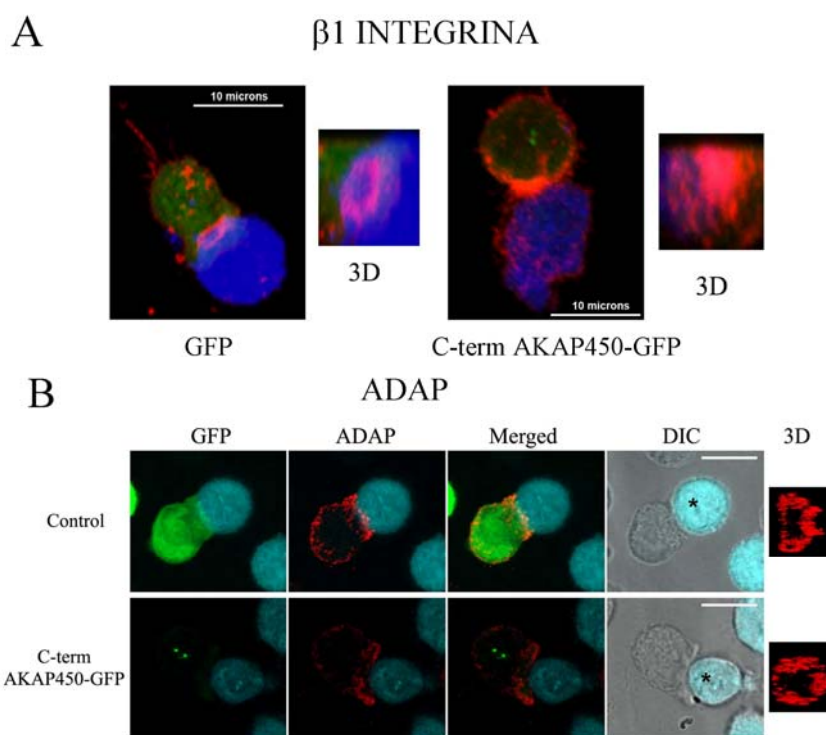


Figura 20: La proteína AKAP450 en la organización de diferentes moléculas presentes en el p-SMAC en la SI. (A, B) Los conjugados T-APC transfectados con GFP o C-term AKAP450-GFP se procesaron y marcaron para la integrina $\beta 1$ (A) y ADAP (B) (rojo). Se muestran las imágenes de confocal y las correspondientes reconstrucciones en 3D de la SI. Las barras equivalen a 10 μ m.

2.2.- Papel de AKAP450 en la activación de la integrina LFA-1 en la sinapsis inmune.

Para caracterizar más a fondo el papel de AKAP450 en la correcta configuración del p-SMAC dentro de la SI, se decidió estudiar el nivel de activación de la integrina LFA-1 mediante microscopía confocal. La unión del ligando específico a los dominios extracelulares de las integrinas durante el contacto T-APC desencadena una señalización intracelular que

induce un cambio conformacional en la integrina, pasando a un estado activo. Para estudiar el efecto de la sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP en la activación de LFA-1, se usaron dos anticuerpos que reconocen la conformación activa de la integrina: m24 y KIM127. En concreto, se trata de dos anticuerpos monoclonales que reconocen el dominio I-like y el dominio EGF2 de la subunidad beta2 de la integrina, respectivamente (Lu et al., 2001a; Lu et al., 2001b). El análisis de los conjugados T-APC mostraba una clara reducción en el nivel de activación de LFA-1 en las células que sobreexpresaban C-term AKAP450-GFP con respecto a los controles GFP (**Figura 21A**). Se analizó con ayuda del Image J (ver Materiales y Métodos) la señal de integrina activa en la SI formada y se observó que la población de conjugados T-APC control poseía una mayor intensidad de fluorescencia para la integrina LFA-1 activa con respecto a la de los conjugados que sobreexpresaban el dominante negativo para AKAP450 (incremento 2,4 versus 1,1) (**Figura 21B**). Un resultado similar se obtuvo cuando se utilizó el anticuerpo KIM127 (incremento 3,2 versus 1,4) (**Figura 21B**). Juntos, estos datos sugieren la implicación de AKAP450 en la activación de LFA-1 en la SI.

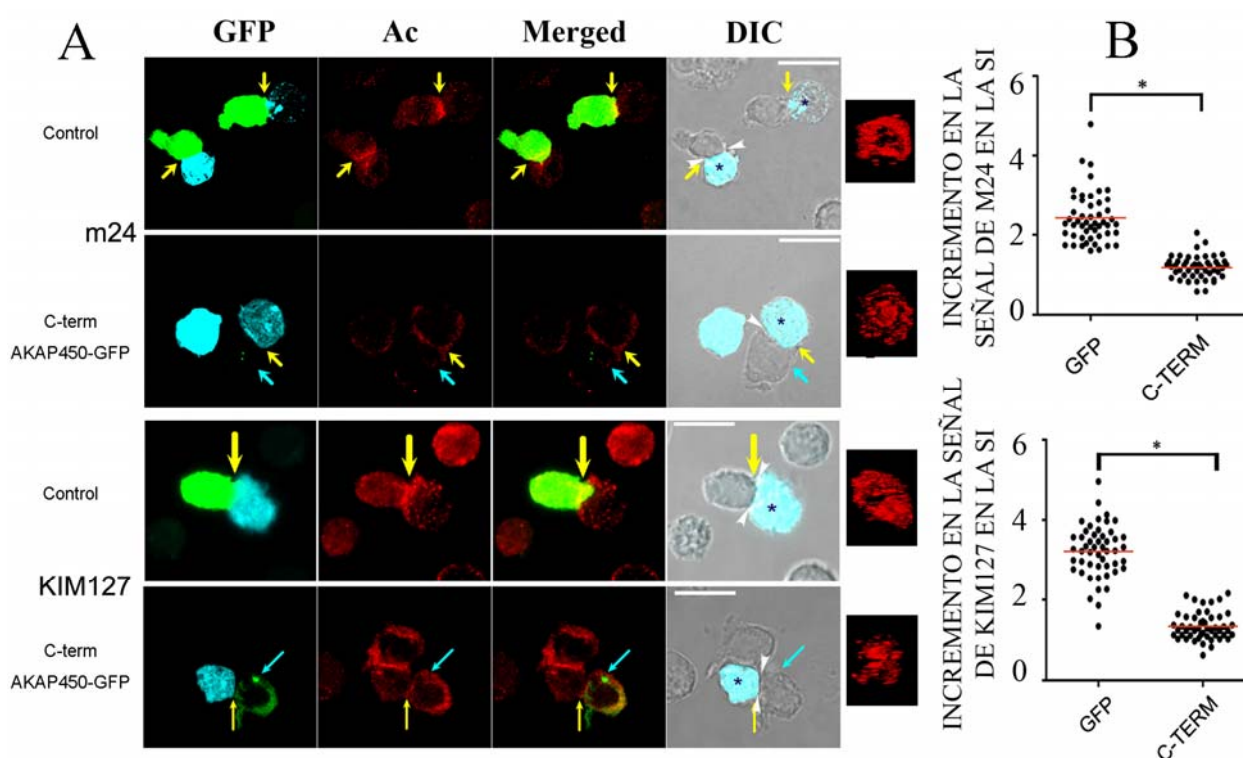


Figura 21: La proteína AKAP450 en la activación de la integrina LFA-1 tras la formación del conjugado T-APC. (A) Los conjugados formados entre células CH7 que expresan GFP o C-term AKAP450-GFP y las células Hom2 cargadas con el péptido HA (50 µg/ml) se tiñeron con los anticuerpos capaces de reconocer la conformación activa de LFA-1 (rojo), m24 (panel superior) y KIM127 (panel inferior). Las imágenes de confocal y las reconstrucciones 3D se procesaron como en la figura 18. Las flechas y los asteriscos son como en la figura 18. Las barras equivalen a 10 µm. (B) Los gráficos muestran la cuantificación de la acumulación de LFA-1 activa (m24: panel superior; KIM127: panel inferior) en la SI. Se contaron un total de 50 conjugados por condición. * indican $P < 0.01$ comparado con los controles CH7C17 GFP (Test de Mann-Withney).

2.3.- La supresión de la función de AKAP450 afecta a diferentes eventos de señalización relacionados con la activación de la integrina LFA-1.

Aparte del papel descrito en adhesión, la integrina LFA-1 participa como molécula coestimuladora en diferentes eventos de señalización de la célula T, potenciando en muchos casos la señal derivada de la activación del complejo TCR/CD3. Por ejemplo, la activación de LFA-1 resulta en una producción sostenida de inositol trifosfato (IP_3) y, por tanto, de un incremento de Ca^{2+} intracelular, además de una fuerte activación de PLC γ 1 (Kim et al., 2009). Por otra parte, se ha descrito la activación de Rac1, miembro de la familia de las Rho-GTPasas, tras la activación de LFA-1, en una vía dependiente de PI3K y VAV1 (Sánchez-Martín et al., 2004). Además, diferentes moléculas de señalización como SLP-76, isoenzimas de PKC o tirosina-quinazas también se activan con motivo de la activación de LFA-1 (Baker et al., 2009; Porter et al., 2002; Rodríguez-Fernández et al., 2002). Para examinar el papel potencial de AKAP450 en alguno de estos eventos, estudiamos la fosforilación de PLC γ 1 mediante WB en conjugados T-APC a distintos tiempos de estimulación antigénica. Estos experimentos revelaron que la fosforilación de PLC γ 1 estaba significativamente disminuida en los conjugados J77-Raji que sobreexpresaban C-term AKAP450-GFP (**Figura 22B**), lo cual sugiere que la actividad de PLC γ 1 podría estar afectada en estas células. Para profundizar aún más en este punto, posteriormente se redujo la expresión de AKAP450 endógena en las células T mediante el uso de oligos interferentes para la misma (siAKAP450), obteniendo un descenso de la expresión en torno al 65-75% con respecto a los controles (**Figura 22A**). En este caso, se analizó de nuevo la fosforilación de PLC γ 1 y se obtuvieron resultados similares tanto en células J77 como CH7C17 interferidas para AKAP450 (**Figura 22B**). También se analizó el nivel de activación de PKC θ en aquellas células que sobreexpresaban C-term AKAP450-GFP e interferidas para AKAP450. Se estudió el grado de fosforilación de la proteína mediante WB observándose una disminución a lo largo del tiempo con respecto a los controles (**Figura 22C**). Además, se investigó la localización de la proteína PKC θ en los conjugados T-APC mediante microscopía confocal. PKC θ se recluta específicamente a la SI tras la activación del linfocito T (Altman and Villalba, 2003). El análisis del acúmulo de PKC θ en los conjugados a tiempos cortos (5 min) tras el contacto T-APC mostraba un defecto en el reclutamiento de la misma, siendo mucho mayor a tiempos largos (20 min), correlacionando con la reducción observada en la fosforilación de PKC θ en Thr538 (**Figura 23, A y B**).

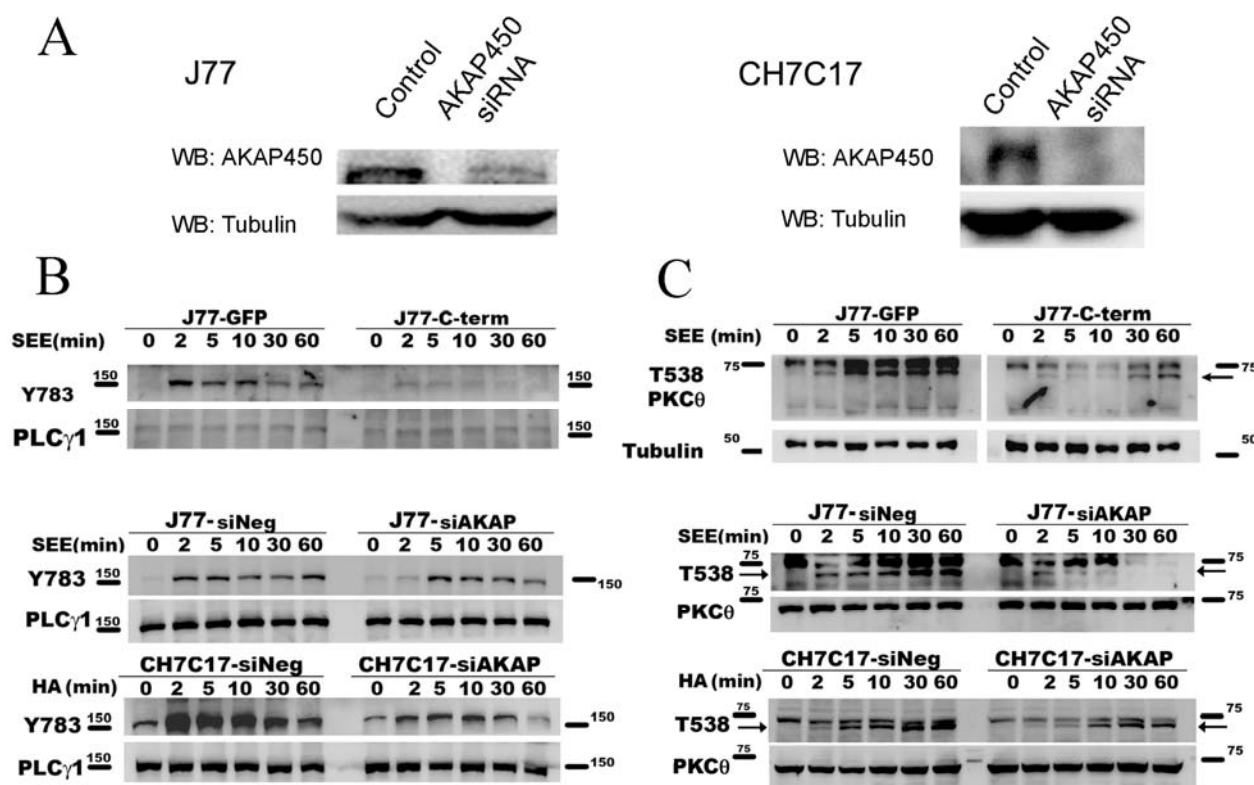


Figura 22: Efecto de la pérdida de función de AKAP450 en la fosforilación de diferentes moléculas de señalización asociadas a la activación de la integrina LFA-1. (A) Las células J77 y CH7C17 se transfectaron con siRNA control (siNeg) o siRNA de AKAP450 (siAKAP), y la expresión de AKAP450 y tubulina se determinó mediante WB. (B) WB superior, las células J77 expresando GFP (J77-GFP) o C-term AKAP450-GFP (J77-C-term) se conjugaron con células Raji a los tiempos indicados. Se muestra un WB representativo de p-PLCγ1 (Y783). La expresión total de PLCγ1 se utilizó como control de carga. WB inferiores, los conjugados J77/Raji y CH7C17/Hom2 que expresan siRNA control (siNeg) o siRNA de AKAP450 (siAKAP) se conjugaron como en el apartado anterior y se muestra un WB representativo de p-PLCγ1 (Y783) para cada caso. La expresión total de PLCγ1 se detectó como control de carga. (C) Los lisados correspondientes a los conjugados T-APC se utilizaron de nuevo para observar p-PKCθ (T538) y PKCθ total. Se muestra uno de cuatro experimentos representativos.

2.4.-El dominante negativo de AKAP450 impide la activación completa del complejo TCR/CD3 y la señalización posterior que se desencadena.

Inicialmente las moléculas de adhesión como LFA-1 e ICAM-1 localizan en la zona central del contacto T-APC precediendo al complejo TCR/CD3 que posteriormente relocaliza en la zona central desplazando a las integrinas al p-SMAC (Grakoui et al., 1999). Al haber observado una configuración y activación alterada de la integrina LFA-1, se decidió estudiar si también el nivel de activación del complejo TCR/CD3 en el c-SMAC estaba afectado. Cuando las células T interactúan con las APCs, la cadena epsilon de CD3 (CD3ε) sufre un cambio conformacional que puede ser detectado por diferentes anticuerpos, como es el caso de APA1/1 (Risueno et al., 2005).

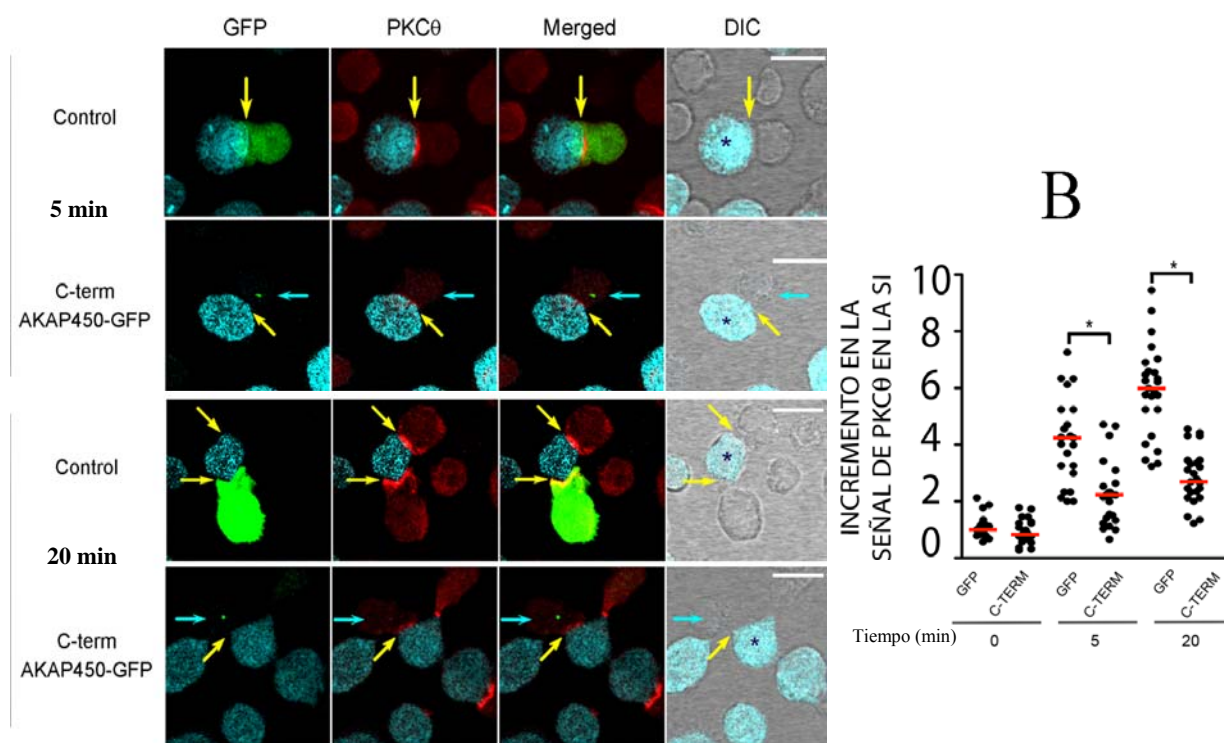


Figura 23: Efecto de la sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP sobre el reclutamiento de PKCθ en la SI. (A) Los conjugados se formaron entre las células J77 expresando GFP o C-term AKAP450-GFP y las células Raji en presencia de SEE (0,5 µg/ml) a los tiempos indicados (5 min, panel superior; 20 min, panel inferior), y se marcaron para PKCθ (rojo). Las flechas y los asteriscos son como en la figura 18. Las barras equivalen a 10 µm. (B) La gráfica muestra la cuantificación de la acumulación de PKCθ a los tiempos indicados en la SI. Los valores representan la media aritmética de 25 conjugados y están normalizados con respecto al control GFP +/- SD. * indica P < 0.05 (Test de la t de Student).

El análisis de los conjugados formados entre células J77 que sobreexpresaban C-term AKAP450-GFP con células Raji en presencia de SEE reveló una reducción clara en la señal de CD3 activado comparado con los controles GFP (**Figura 24A**). Para cuantificar este efecto, se midió la relación existente entre la señal detectada para APA1/1 y el CD3 total en la zona de contacto T-APC, mostrando una reducción evidente en la señal de APA1/1 en las células C-term AKAP450-GFP con respecto a la señal de CD3 total (**Figura 24B**). Para corroborar estos datos, se estudió por WB el nivel de fosforilación de CD3 a lo largo del tiempo utilizando un anticuerpo que reconoce la fosforilación en tirosina de la cadena zeta de CD3 (CD3ζ), y se observó que la sobreexpresión del dominante negativo para AKAP450 impedía la fosforilación correcta de la molécula de CD3, confirmando los datos obtenidos con el anticuerpo APA1/1 en inmunofluorescencia (**Figura 24C**).

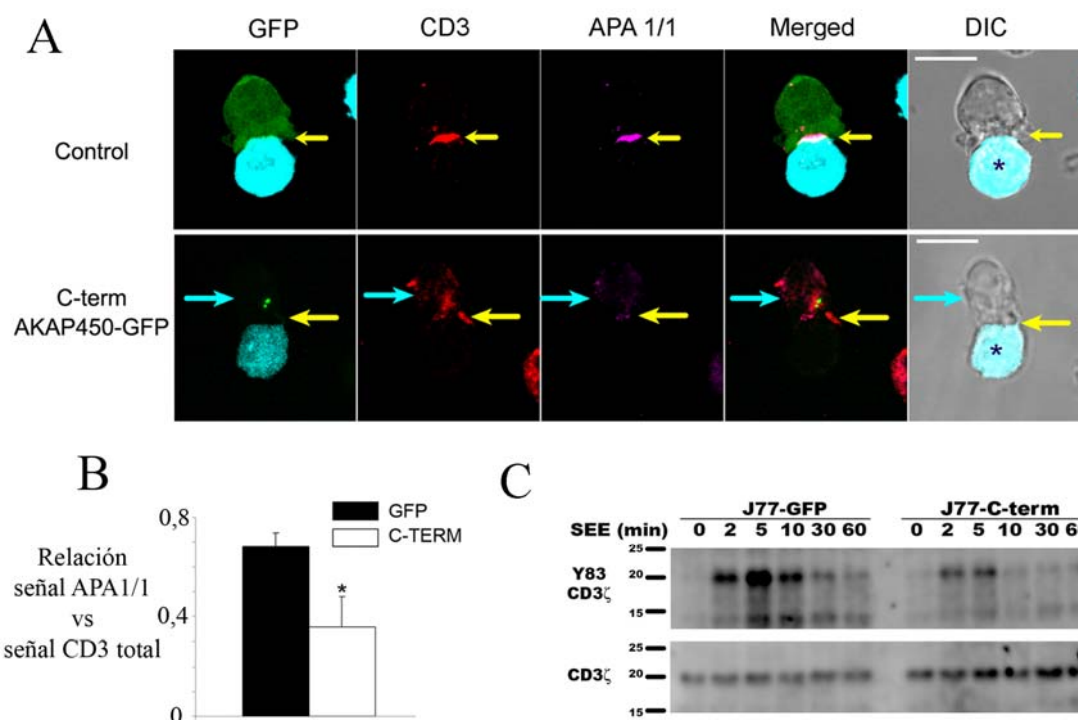


Figura 24: La sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP impide la activación completa del complejo CD3/TCR. (A) Los conjugados se formaron entre las células J77 que expresan GFP o C-term AKAP450-GFP y células Raji en presencia de SEE (0,5 µg/ml), y teñidas para CD3ζ (rojo) y CD3ε activado (magenta). Las flechas y los asteriscos son como en la figura 18. Las barras equivalen a 10 µm. (B) El histograma muestra la relación entre la señal de APA1/1 y la señal de CD3 total en los conjugados formados en la parte A. Se analizaron un total de 50 conjugados por condición. Los resultados son la media aritmética +/- SD; * indica $P < 0.05$ comparado con las células J77 control GFP (Test de la t de Student). (C) WB representativo de p-CD3ζ (Y83) en los conjugados J77/SEE-Raji formados como en la parte A. La expresión de CD3 total se utilizó como control de carga. Se muestra uno de cuatro experimentos representativos.

Dado que la señal principal que desencadena la activación del linfocito T parte del complejo TCR/CD3 y tras observar que éste se encuentra alterado en las células T que sobreexpresan C-term AKAP450-GFP, pensamos que la señalización desencadenada por la activación del TCR podría estar también afectada. Para confirmarlo, se analizó mediante WB la fosforilación específica de proteínas de señalización importantes para la activación del linfocito T como se ha hecho en puntos anteriores del trabajo. La fosforilación de LAT se observó inicialmente tras estimulación con el SEE pero, significativamente a diferencia de las células control, no fue sostenida a lo largo del tiempo y se encontraba disminuida tanto en las células J77 que sobreexpresaban C-term AKAP450-GFP como en las células J77 interferidas para AKAP450 (**Figura 25 y 26A**). También se analizó la activación de VAV1, unida a la fosforilación de LAT en su tirosina 191 (Paz et al., 2001). La fosforilación de esta proteína estaba reducida en las células J77 que tenían afectada la funcionalidad de AKAP450, correlacionando con los tiempos observados para la fosforilación de LAT (**Figura 25 y 26A**).

La fosforilación de CD3 ζ (Y83), LAT (Y191) y VAV1 (Y174) también se encontraba afectada en las CH7C17 interferidas para AKAP450 (**Figura 26B**), en paralelo a lo que ocurre con la sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP.

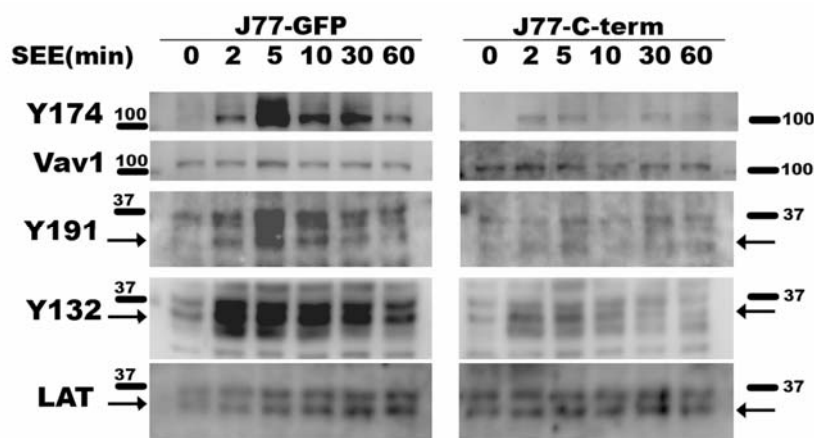


Figura 25: La sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP afecta a las rutas de señalización derivadas de la activación del TCR. Las células J77 que expresan GFP (J77-GFP) o C-term AKAP450-GFP (J77-C-term) se conjugaron con células Raji a los tiempos indicados y los extractos celulares se procesaron tanto para las formas fosforiladas de Vav1 y LAT, como para la proteína total, utilizada como control de carga. Las flechas indican la banda correspondiente a la proteína de estudio. Uno de cuatro experimentos representativos se muestra.

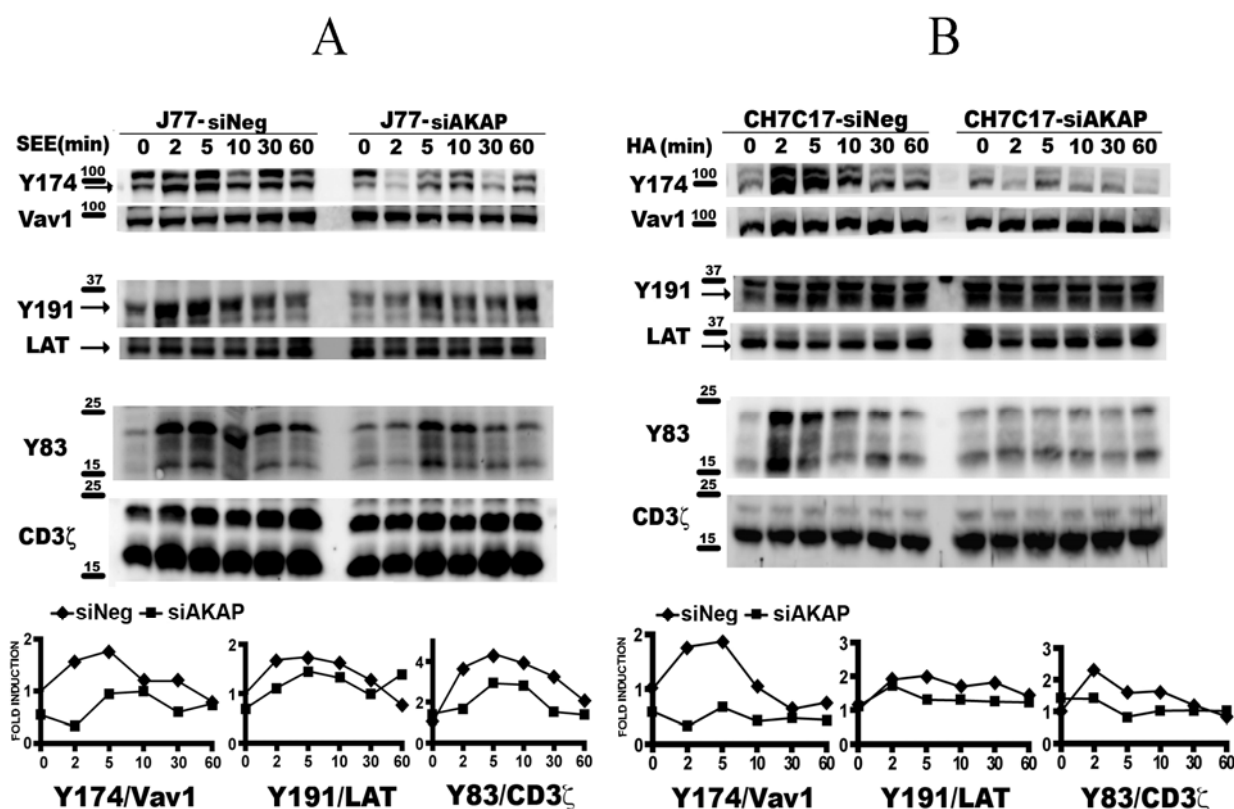


Figura 26: El silenciamiento de AKAP450 impide la activación de moléculas implicadas en la señalización del linfocito T. (A, B) Los diferentes WB muestran el grado de fosforilación de diferentes moléculas de señalización como en la figura 23 y 24. Los pares T-APC analizados fueron J77/SEE-Raji (A) y CH7C17/HA-Hom2 (B). Se muestra uno de cuatro experimentos representativos. Las flechas indican la banda correspondiente a la proteína de estudio. Las gráficas muestran los análisis densitométricos de los WB de los paneles A y B.

2.5.- Implicación de AKAP450 en la dinámica del citoesqueleto del linfocito T.

En estudios realizados en células epiteliales y fibroblastos, la proteína AKAP450 se localiza en el aparato de Golgi y el MTOC controlando la función del centrosoma durante el ciclo celular (Keryer et al., 2003), la organización del Golgi (Larocca et al., 2004) y la nucleación de los microtúbulos (Rivero et al., 2009). Sin embargo, en los linfocitos T, la sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP no parecía afectar a la organización clásica del Golgi, observada a nivel de microscopía confocal (**Figura 27**).

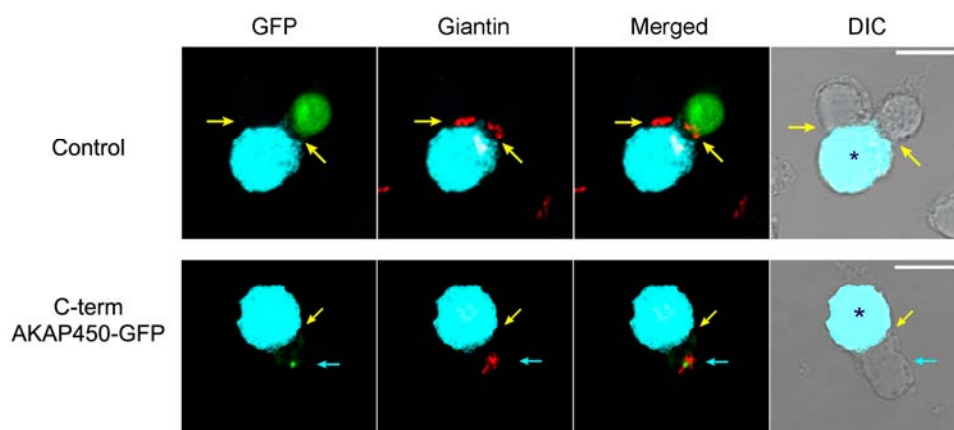


Figura 27. La sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP no afecta a la estructura del Golgi pero impide su translocación al contacto T-APC. Las células J77 se conjugaron con células Raji en presencia de SEE (0,5 $\mu\text{g/ml}$) y los conjugados formados se incubaron con el anticuerpo que reconoce el aparato de Golgi (giantina). Las células que sobreexpresan la construcción C-term AKAP450-GFP no translocan el aparato secretor a la SI. Las flechas y los asteriscos son como en la figura 18. Las barras equivalen a 10 μm .

Sin embargo, en relación con el MTOC, ¿qué papel puede estar desempeñando AKAP450 en su movimiento a la SI?. La sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP deslocalizaba el MTOC del área de contacto entre la célula J77 y la célula Raji en presencia de SEE (**Figura 28A, panel superior**). Un efecto similar se obtuvo cuando la sobreexpresión se llevó a cabo en células CH7C17 (**Figura 28, panel inferior**). El análisis cuantitativo de estos experimentos mostraba que sólo el 39% de los conjugados contabilizados del par celular J77-Raji que sobreexpresaban C-term AKAP450-GFP translocaban correctamente el MTOC a la SI, comparado con el 82% de conjugados control J77-Raji que sobreexpresaban GFP (**Gráfica en Figura 28A**). Un resultado similar se obtuvo en los conjugados CH7C17-Hom2, donde la translocación del MTOC sólo fue detectada en el 37% de las CH7C17 que sobreexpresaban C-term AKAP450-GFP, comparado con el 78% de las células control (**Gráfica en Figura 28A**). Para aclarar aún más el efecto de la pérdida de función de AKAP450, se estudió el efecto de la sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP en

linfoblastos T humanos conjugados con Raji en presencia de SEE, observándose un efecto similar al obtenido con las células T J77 y CH7C17 (**Figura 27B**).

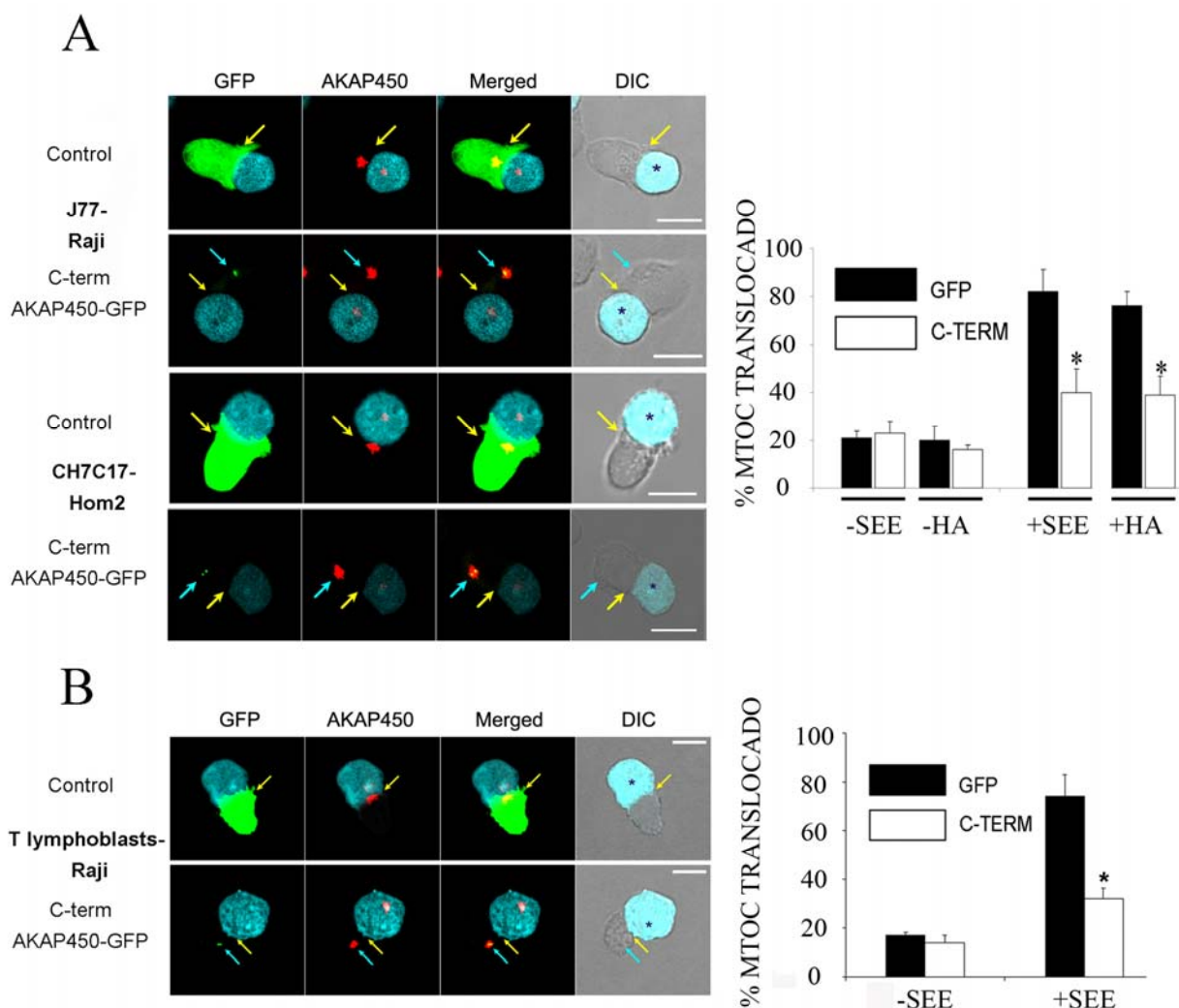


Figura 28: La polarización del MTOC se inhibe por la sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP. (A)

Panel superior, los conjugados celulares se formaron entre células J77 control GFP o C-term AKAP450-GFP y células Raji estimuladas con SEE (0,5 $\mu\text{g/ml}$) y cargadas con CMAC. Las células se marcaron para AKAP450 endógena (rojo). **Panel inferior**, los conjugados se realizaron entre células CH7C17 expresando GFP (control) o C-term AKAP450-GFP y células Hom2 estimuladas con HA (50 $\mu\text{g/ml}$) y cargadas con CMAC. De nuevo las células se tiñeron para AKAP450 endógena (rojo). En la gráfica de la derecha se muestra la cuantificación de la translocación del MTOC en los conjugados formados. Se contaron en torno a 300 conjugados para cada condición. **(B)** Los linfoblastos T que expresan GFP o C-term AKAP450-GFP se incubaron con células Raji estimuladas con SEE (0,5 $\mu\text{g/ml}$) y cargadas con CMAC, y los conjugados formados se marcaron de nuevo para AKAP450 endógena (rojo). Las flechas y los asteriscos son como en la figura 18. Las barras equivalen a 10 μm . En la gráfica de la derecha se muestra la cuantificación como en la parte A. Se contaron más de 50 conjugados para cada condición. Los resultados en ambas gráficas son la media aritmética \pm SD; * indican $P < 0.05$ comparado con las células T control GFP (Test de la t de Student).

Al igual que en el caso del complejo motor dineína/dinactina, se monitorizó el movimiento del MTOC en células T J77 mediante videomicroscopía confocal con el objetivo de observar exactamente el efecto que producía la sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP sobre dicho movimiento. En las células que sobreexpresaban el dominante negativo para AKAP450 no se observó una translocación evidente del MTOC, incluso 30 min después de la formación del conjugado T-APC (**Figura 29, M1**). Por el contrario, en el caso de las células T J77 control que sobreexpresaban paxilina-GFP (Herreros et al., 2000), el MTOC se moviliza directamente a la SI en los primeros 5 min del contacto entre las células (**Figura 29, M2**).

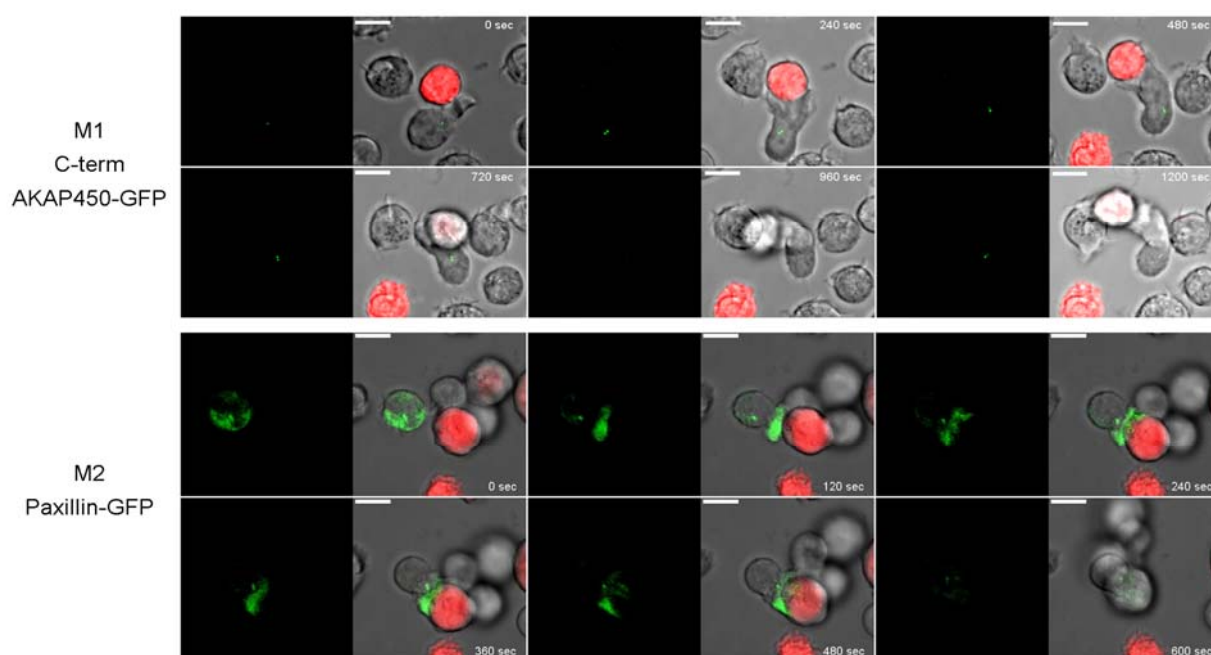


Figura 29: La sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP impide el movimiento correcto del MTOC a la SI. Las células J77 que expresan C-term AKAP450-GFP (M1) o Paxilina-GFP (M2) se incubaron con las células Raji cargadas con SEE (0,5 μg/ml) y marcadas con CMTMR (rojo), y distintas secuencias tomadas mediante vídeo-microscopía confocal se muestran a los tiempos indicados. Las imágenes se capturaron a 37°C. El tiempo se muestra en segundos. M, movie (película). Las barras equivalen a 10 μm.

Dado el efecto observado sobre el MTOC al sobreexpresar el dominante negativo para AKAP450, se decidió estudiar si el silenciamiento de AKAP450 tenía un efecto similar en la translocación del MTOC. Tanto las células T J77 como CH7C17 interferidas para AKAP450 conjugadas con sus respectivas APCs mostraban una inhibición en las translocación del MTOC comparable a la observada con la sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP (**Figura 30**). En conclusión, se puede afirmar que AKAP450 es requerida para la polarización correcta del citoesqueleto de tubulina y el MTOC a la SI.

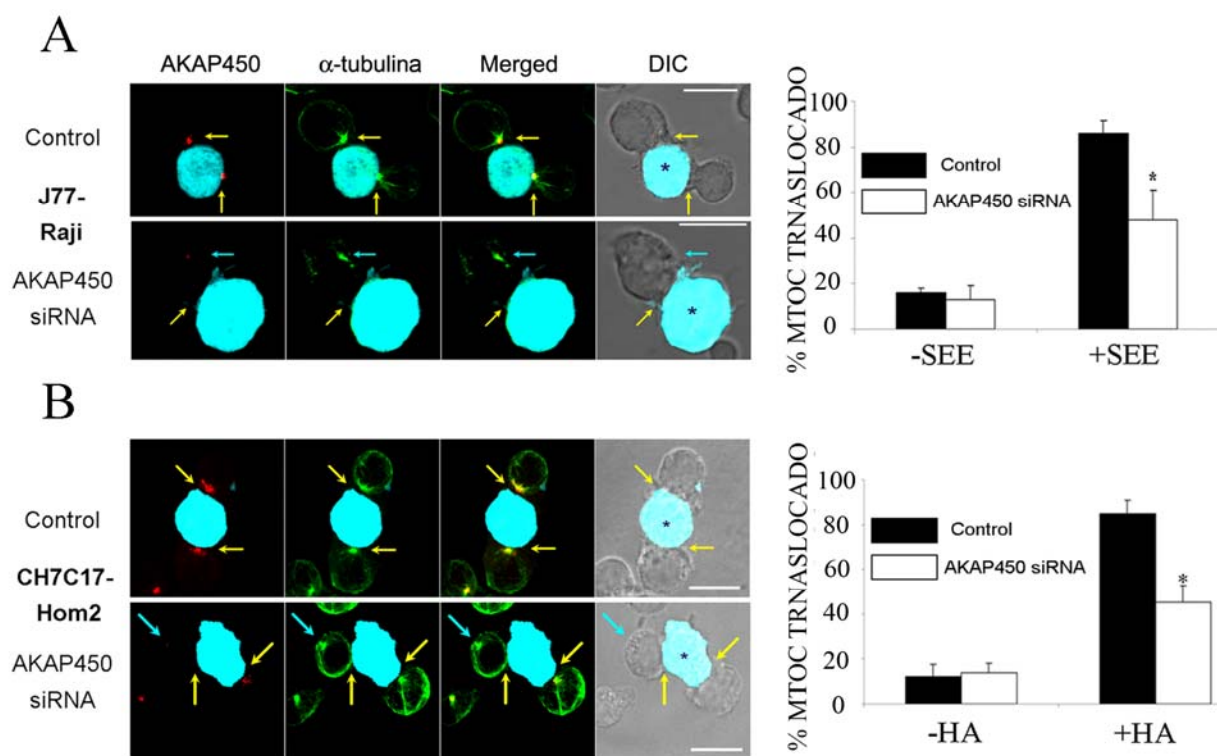


Figura 30: El silenciamiento de AKAP450 impide la translocación del MTOC a la zona de contacto T-APC. (A) Las células J77 y **(B)** CH7C17 se transfectaron con siRNA control o siRNA para AKAP450, y los conjugados se formaron como en la figura 27. Posteriormente, se tiñeron para AKAP450 endógena (rojo) y α -tubulina (verde). Las flechas y asteriscos son como en la figura 18. Las barras equivalen a 10 μ m. En las gráficas de la derecha se muestra la cuantificación de la translocación del MTOC en los conjugados formados. Se contaron más de 200 conjugados para cada condición. Los resultados son la media aritmética \pm SD de la translocación del MTOC; * indican $P < 0.05$ comparado con las células J77 o CH7 control GFP (Test de la t de Student).

Por otro lado, se estudió si también el citoesqueleto de actina se encontraba afectado cuando se alteraba la función de AKAP450. La reducción en los niveles de fosforilación de VAV1 nos sugería que la polimerización de actina podría encontrarse afectada en las células que sobreexpresan C-term AKAP450-GFP. Para ello, se midieron los niveles de F-actina en las células T mediante citometría de flujo y microscopía confocal. Tanto en las células J77 como en las células T primarias $CD4^+$ se observó un defecto en la polimerización de actina en respuesta a anticuerpos (anti-CD3/CD28) (**Figura 31A**), y el análisis de imágenes de microscopía confocal reveló unos niveles reducidos de F-actina en la SI tanto de las células J77 como de los linfoblastos T que sobreexpresaban C-term AKAP450-GFP con respecto a los controles GFP (**Figura 31B**), lo cual correlaciona con el defecto en la fosforilación de VAV1. Por tanto, de una manera más indirecta, ya que no se conoce el nexo de unión entre AKAP450 y el citoesqueleto de actina, AKAP450 podría regular el correcto comportamiento del citoesqueleto de actina durante la activación del linfocito T.

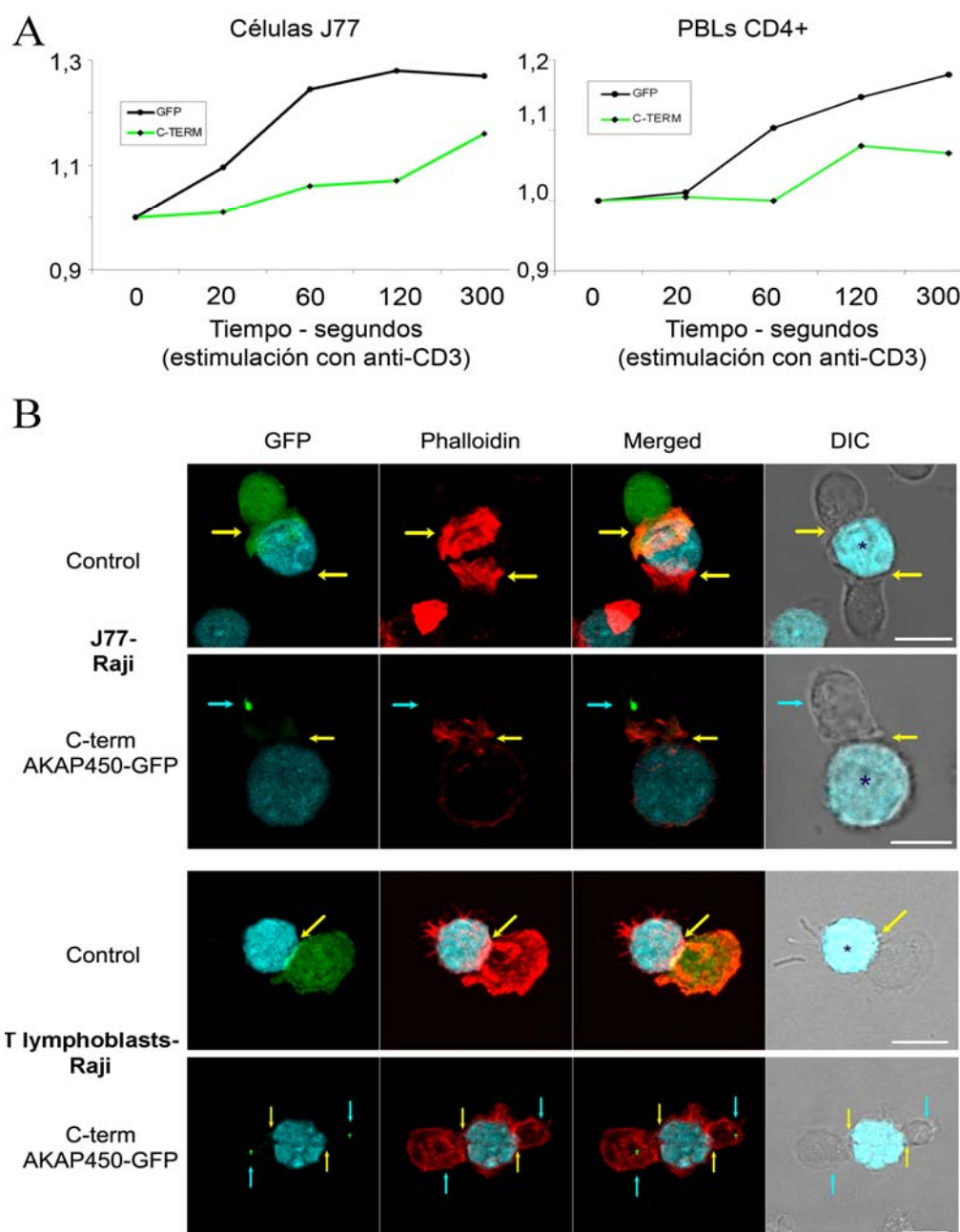


Figura 31: La polimerización de actina se encuentra afectada por la sobreexpresión del dominio C-terminal de AKAP450. (A) Las células T se estimularon con anti-CD3 (10 µg/ml) a los tiempos indicados y se marcaron con faloidina; el contenido en F-actina se analizó por citometría de flujo. (B) Los conjugados formados entre células J77 (panel superior) o linfoblastos T (panel inferior) expresando GFP o C-term AKAP450-GFP y Raji cargadas con SEE (0,5 µg/ml) se tiñeron con faloidina (rojo). Las flechas y asteriscos son como en figura 18. Las barras equivalen a 10 µm.

2.6.- La supresión de la función de AKAP450 impide la secreción polarizada de IL-2 durante la formación de la sinapsis inmune.

La secreción polarizada de citoquinas, como por ejemplo IL-2, hacia la zona de contacto con la célula presentadora es uno de los eventos iniciales que se observan tras la

activación del linfocito T (Huse et al., 2006). La producción de IL-2 es dependiente de la activación de la ruta de las MAPs quinasas (ERK1/2) (Gomez and Billadeau, 2008). Por ello, como medida de la activación completa del linfocito T, se estudió el nivel de fosforilación de ERK1/2 en las células J77 que sobreexpresaban el dominante negativo para AKAP450 o bien en las que estaban silenciadas, observándose mediante WB una reducción considerable en la fosforilación de ERK1/2 en estas células (**Figura 32**). De acuerdo con estos datos, en ambas condiciones, la producción de IL-2 se encontraba considerablemente disminuida, detectada a las 16 h de la formación de los conjugados T-APC (**Figura 32**). Sin embargo, la expresión en superficie de la molécula CD69 no se afectó significativamente (**Figura 32**).

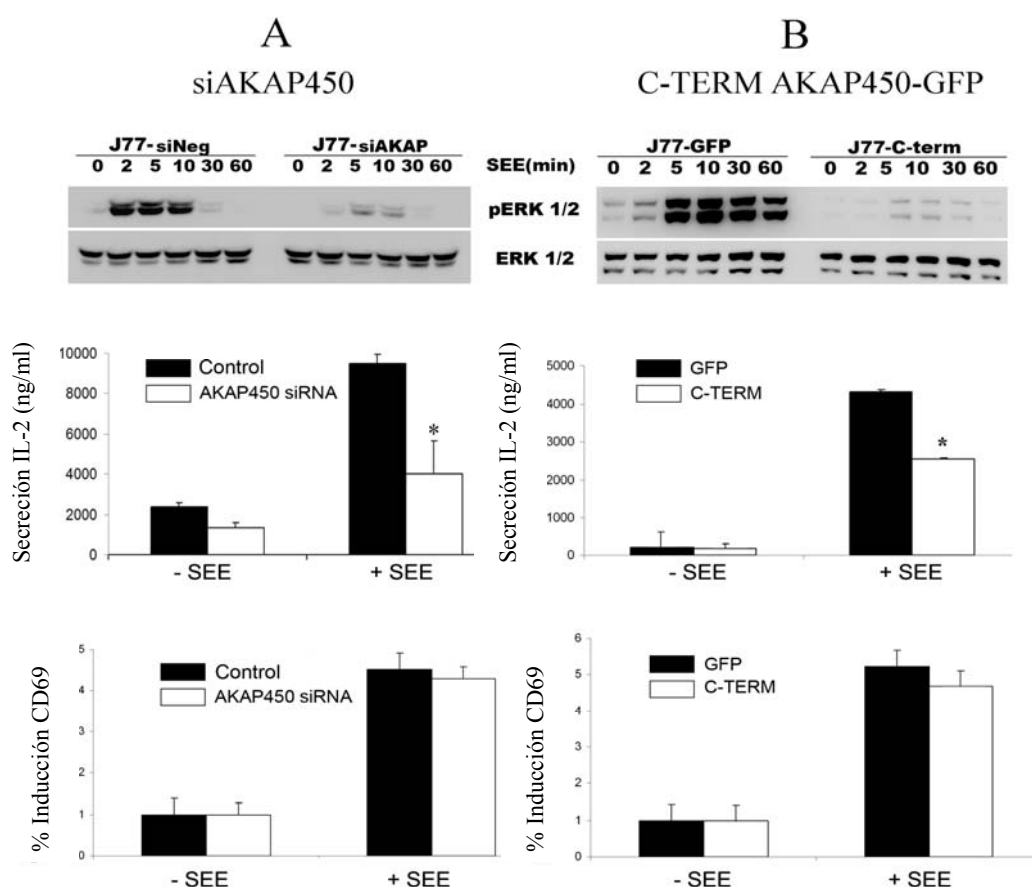


Figura 32: La producción de IL-2 se impide tanto por la sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP como por el silenciamiento de AKAP450. (A) Los conjugados J77/SEE-Raji expresando por un lado siRNA control (siNeg) o siRNA de AKAP450 (siAKAP), y por otro, GFP (J77-GFP) o C-term AKAP450-GFP (J77-C-term) se incubaron a los tiempos indicados y se muestra un WB representativo de p-Erk1/2 (T202/Y204). La expresión total de Erk1/2 se detectó como control de carga. Uno de tres experimentos representativos se muestra. (B) La secreción de IL-2 se detectó mediante ELISA en los sobrenadantes recogidos del cultivo de los conjugados formados entre células Raji estimuladas con SEE y células J77 transfectadas como en el apartado A. (C) La expresión en superficie de la molécula CD69 en los conjugados formados como en el apartado A se detectó mediante citometría de flujo. Los datos son la media aritmética \pm SD de tres experimentos realizados por triplicado. * indican $P < 0.05$ (Test de la t de Student).

DISCUSIÓN

Más de un cuarto de siglo ha pasado ya desde el descubrimiento de la polarización del citoesqueleto celular tras el contacto entre la célula T y su correspondiente célula presentadora de antígeno, siendo este proceso necesario para la formación de una sinapsis inmune productiva. Sin embargo, ahora es cuando se empieza a dilucidar el papel esencial que parecen desempeñar tanto la F-actina como los microtúbulos en la regulación de la formación de la SI, la señalización, la secreción, la migración, la adhesión y un largo etcétera de funciones efectoras del linfocito T, produciéndose en la última década una explosión de información referente a la regulación de la dinámica del citoesqueleto en las células T. Esto se ha debido fundamentalmente a la caracterización funcional de numerosas moléculas reguladoras del citoesqueleto en otros tipos celulares, los cuales han sido extrapolados a la célula T. Adicionalmente, el uso de ARN de interferencia y la generación de diferentes modelos animales además de la caracterización de numerosas enfermedades en las cuales estos reguladores están alterados, han ayudado a identificar nuevos candidatos implicados en el control del citoesqueleto del linfocito T. Además, el uso de nuevas técnicas de microscopía y diferentes herramientas que permiten obtener una resolución espacio-temporal de moléculas de señalización durante la activación del linfocito T han tenido un impacto profundo en el entendimiento de la regulación del citoesqueleto celular.

Por tanto, el citoesqueleto parece estar ejerciendo un papel relevante en las funciones del linfocito T. En este estudio, se ha analizado el papel que juega el citoesqueleto de tubulina, y en particular, el centro organizador de microtúbulos (MTOC), en la correcta formación de la SI y la consiguiente activación del linfocito T. En concreto, se ha estudiado el papel del complejo motor dineína/dinactina y de la proteína adaptadora AKAP450 en la dinámica del citoesqueleto de tubulina y en la activación completa de la célula T.

1.- DINEÍNA/DINACTINA

1.1.- El complejo dineína/dinactina y el citoesqueleto de tubulina del linfocito T: la translocación del MTOC a la sinapsis inmune.

El movimiento del MTOC y su posicionamiento han sido analizados anteriormente en relación con la dineína en numerosos procesos funcionales, tales como la polarización y división de la célula (Hook and Vallee, 2006; Vallee and Stehman, 2005). La dineína citoplasmática forma un multicomplejo que se ha detectado en posiciones variadas de la célula, incluyendo su asociación con el MTOC y su unión a los microtúbulos durante el transporte de gran variedad de cargos (Vallee et al., 2004), y, lo más notable para nuestro estudio, en el córtex celular (Busson et al., 1998). Los complejos dineína/dinactina también

podrían ser importantes en la fisiología del linfocito T ya que el posicionamiento del MTOC durante la activación del linfocito T ayuda a que se lleven a cabo diferentes funciones efectoras tales como la secreción de citoquinas (Kupfer et al., 1991) y la muerte de células diana, bien infectadas por virus o bien cancerosas (Kupfer et al., 1985; Stinchcombe et al., 2006). En nuestro estudio se aportan evidencias experimentales por las cuales podemos afirmar que el complejo dineína/dinactina se requiere funcionalmente para dirigir el MTOC a la zona de contacto entre la célula T y la APC. Con este propósito, se afectó el funcionamiento correcto del complejo dineína/dinactina o bien impidiendo su función mediante la sobreexpresión de la subunidad p50-dinamitina-GFP o bien previniendo su formación mediante el silenciamiento de la expresión de la cadena pesada de dineína (DHC). Nuestro hallazgo de que el complejo dineína/dinactina está involucrado en la translocación del MTOC a la SI es relevante porque la cadena intermedia de dineína p74 parece agruparse en el p-SMAC, donde colocaliza con ADAP (Combs et al., 2006). Sin embargo, mientras que este trabajo no describía la regulación del complejo dineína y su participación en la formación de la SI, nuestros resultados proporcionan evidencias suficientes para afirmar que los complejos dineína/dinactina cooperan para que se lleve a cabo la relocalización del MTOC a la SI. Nuestros resultados muestran que la sobreexpresión de p50-dinamitina-GFP impide la interacción entre la subunidad p74 y la subunidad de dinactina p150^{glued}, previniendo la formación del macrocomplejo tras la estimulación antigénica, resultando en un movimiento defectuoso. Sin embargo, la sobreexpresión de p50-dinamitina-GFP no previene la localización de las subunidades de dineína y dinactina en la SI pero sí parece interferir con su actividad hacia los microtúbulos. Además, la reducción de la expresión endógena de la cadena pesada de dineína mediante el uso de oligos interferentes también impide la translocación del MTOC. Esto apoya un modelo en el cual los complejos dineína/dinactina se anclan en la periferia de la SI y atraen los microtúbulos hacia sí arrastrando al MTOC. Además, la inhibición del ensamblaje de los microtúbulos con nocodazol altera el posicionamiento del MTOC de una manera dependiente de la actividad de dineína, siendo la contractilidad del complejo actomiosina importante en este proceso (Burakov et al., 2003). Estas observaciones, junto con la pérdida de la dineína cortical tras el tratamiento con citocalasina D (Busson et al., 1998), indican un papel del citoesqueleto de actomiosina en el posicionamiento del MTOC. Estas observaciones están en concordancia con nuestros datos sobre la situación y anclaje del complejo dineína/dinactina en el p-SMAC de la SI, donde localiza también el anillo contráctil de actomiosina.

El nexo entre ADAP y dineína descrito anteriormente (Combs et al., 2006) podría ser un mecanismo de reclutamiento del complejo dineína/dinactina al p-SMAC tras la formación de la SI, generándose la tensión necesaria en los microtúbulos que causaría el movimiento del MTOC. Además, se ha descrito que los microtúbulos se anclan a la SI a través del p-SMAC (Kuhn and Poenie, 2002), donde el complejo se localiza y desde donde, por tanto, puede dirigir al MTOC en un movimiento vectorial hacia la periferia de la SI donde se localizaría. A su vez, es conocido que ADAP es un sustrato de la quinasa Fyn, la cual está involucrada en la señalización del TCR (da Silva et al., 1997) y ha sido implicada en la formación del p-SMAC y la producción de IL-2 tras estimulación antigénica (Wang et al., 2004). En nuestro laboratorio se ha descrito previamente la relación existente entre la actividad quinasa de Fyn y la translocación del MTOC a la SI. Además, las células T deficientes para Fyn eran incapaces de translocar correctamente su MTOC a la zona de contacto con la APC (Martin-Cofreces et al., 2006). Por otra parte, Fyn se ha relacionado con el citoesqueleto anteriormente en neuronas a través de la fosforilación de la proteína Tau y su interacción con los complejos γ -tubulina (Lee et al., 2004). Por tanto, es posible que los complejos dineína/dinactina estén directa o indirectamente interaccionando con Fyn (a través de ADAP, por ejemplo) y éste sea un mecanismo que pudiera explicar la activación del complejo dependiente de la activación del TCR, y la posterior reorganización del citoesqueleto de tubulina del linfocito T.

Además, la asociación/disociación del complejo dineína/dinactina dependiente de la estimulación antigénica (SEE) que hemos descrito correlaciona con los cambios observados en la acetilación de tubulina durante este proceso (Serrador et al., 2004), y podría ser una consecuencia de la dinámica de los microtúbulos, reforzando la idea del papel que desempeña este complejo en la organización del citoesqueleto de tubulina en células T.

1.2.- El complejo dineína/dinactina y la maduración de la sinapsis inmune: control de la señalización sostenida del linfocito T por parte del MTOC.

Cuando la actividad del complejo dineína/dinactina está afectada, se ha observado que tanto el MTOC como el aparato secretor de la célula T no son capaces de translocarse a la SI. Se ha descrito que otros motores asociados a los microtúbulos (por ejemplo, las quinesinas, capaces de mover cargos hacia el extremo más de los microtúbulos) son dispensables para desencadenar la función de los CTLs ya que la inhibición del movimiento de los gránulos líticos por parte de las quinesinas promueve su acumulación alrededor del MTOC (el extremo menos de los microtúbulos), pero no se observan defectos en la muerte de

la célula diana ni en la translocación del propio MTOC a la zona de contacto (Stinchcombe et al., 2006). La muerte celular desencadenada mediada por los CTLs es totalmente dependiente de la translocación del complejo MTOC/aparato de Golgi a la SI (Kupfer et al., 1985). Nuestros datos muestran que el fallo en la reorientación del MTOC a la SI tiene consecuencias importantes en la señalización del TCR, la cual es necesaria para la completa activación de la célula T. Esto ayuda a explicar la falta de secreción de citoquinas por las células T cuando el MTOC no se transloca, así como cuando se desregula la actividad de HDAC-6 (Serrador et al., 2004). Nuestros datos revelan la importancia de una translocación correcta del MTOC no sólo para la secreción polarizada de citoquinas sino también para la producción de las mismas. Esto supone un descubrimiento importante porque revela dos puntos de control durante la activación del linfocito T: uno inicial e inmediato, tras el reconocimiento del antígeno por parte del TCR y las señales derivadas del mismo; y otro, la polarización del MTOC, la cual mantiene la señalización inicial del TCR. Así, se han observado deficiencias en la fosforilación de VAV1 en aquellas células en las que está impedida la formación del complejo dineína/dinactina. La fosforilación de VAV1 en la tirosina 174 es un marcador de activación de la molécula (Lopez-Lago et al., 2000). En este sentido, existe un nexo entre la activación de la quinasa Fyn y la fosforilación de VAV1 tras la estimulación antigénica (Huang et al., 2000), y la subsiguiente polarización del MTOC en células deficientes para Fyn (Martin-Cofreces et al., 2006). Además, el MTOC no se transloca correctamente en timocitos doble positivos deficientes para VAV1 (Ardouin et al., 2003). De este modo, la actividad de VAV1 podría ser importante para la translocación del MTOC, y podría facilitar la reorganización de diferentes complejos moleculares en el área de contacto T-APC. Además, se conoce que VAV1 está relacionado con la reorganización del complejo CD3/TCR y LFA-1 en la SI (Krawczyk et al., 2002). Estos resultados destacan un papel diferente para los complejos dineína/dinactina, no sólo en la translocación del MTOC sino en la regulación de la actividad de diversas moléculas importantes en el control de dicho movimiento a través de la señalización temprana derivada del TCR. Todas estas evidencias podrían indicar un papel para el complejo dineína/dinactina como plataforma molecular que nuclea proteínas y suplementa moléculas de señalización a la SI.

La hipótesis de que los complejos dineína/dinactina podrían actuar como sitios de anclaje para la relocalización de diferentes proteínas reguladoras y de señalización en las células T es atractiva porque estos complejos multimoleculares de al menos 1,5 MD ofrecen múltiples dominios de interacción con diferentes proteínas (Vallee and Stehman, 2005). De este modo, el complejo dineína/dinactina podría ser importante para la distribución correcta de proteínas

requeridas para la formación de la SI, y nuestros resultados con LFA-1 y CD3 refuerzan esta hipótesis. Cuando se sobreexpresa p50-dinamitina-GFP, CD3 está distribuido en múltiples agregados próximos al p-SMAC en vez de estar localizado en un único agregado central. La localización alterada de CD3 podría contribuir a la señalización anómala observada en las células que tienen alterada la actividad del complejo dineína/dinactina o en las células silenciadas para DHC. Una explicación alternativa podría ser que el fallo en la translocación del MTOC podría prevenir que la SI adopte una conformación activa o madura como resultado de que no llega un segundo refuerzo de moléculas de señalización, tales como Lck, Fyn (Ley et al., 1994) o LAT (Bonello et al., 2004). Es interesante que cuando diferentes mutantes no fosforilables de LAT se expresan en las células T deficientes para LAT, la reserva intracelular de LAT no se polariza, lo que demuestra que la fosforilación específica de LAT es crucial para su reclutamiento a la SI (Bonello et al., 2004). Sin embargo, nuestros datos no muestran un déficit completo en la fosforilación de LAT tras activación del TCR. Este defecto se podría atribuir a la disminución en la llegada de una segunda onda de moléculas de LAT de las vesículas intracelulares a la SI. Por lo tanto, es concebible que pudieran existir dos ondas de señalización tras la activación del TCR, y que el fallo en la translocación del MTOC (la cual se produce en los primeros 2-5 minutos) pudiera afectar a esa segunda onda de activación. Además, se ha observado que otros eventos señalizadores, tales como la activación de PKC θ o ERK1/2, están ligeramente acelerados. Este efecto podría estar relacionado con el fallo en la activación del TCR, activándose de manera más acentuada otras vías de señalización que compensen dicho déficit, como es el caso de la señalización de integrinas. Por lo tanto, la activación de PKC θ sería regulada por un balance entre la señalización desencadenada por LFA-1 y TCR.

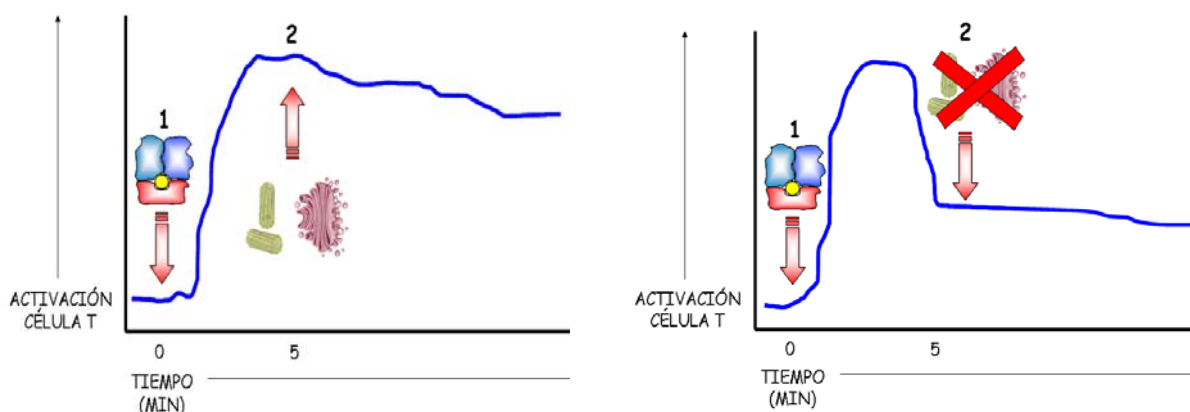


Figura 33: Efecto de la translocación del MTOC sobre la activación del linfocito T. Tras la activación del TCR, se produce una primera y rápida onda de señalización mantenida posteriormente tras la llegada del MTOC (segunda onda) a la SI (**gráfico izquierdo**). Sin embargo, el fallo en la translocación del MTOC afectaría a esa segunda onda de activación e impediría una activación completa de la célula T (**gráfico derecho**).

2.- AKAP450

En los últimos años, se han descrito diferentes proteínas adaptadoras que parecen desempeñar un papel importante en la reorganización molecular que se lleva a cabo durante la formación de la SI, ya sea a través de la unión de diferentes quinasas o fosfatasas, o bien exponiendo sitios de unión para la localización de diferentes componentes del citoesqueleto, siendo atraídos todos ellos a la zona de contacto T-APC (Bauman and Scott, 2002). Entre estas proteínas adaptadoras, las AKAPs son conocidas por ser importantes para mantener la homeostasis de la célula T (Williams, 2002). En nuestro estudio se ha investigado el papel potencial de la proteína adaptadora AKAP450, nexo de unión entre el MTOC y el aparato de Golgi, en la reorganización molecular que conlleva la SI y la señalización que deriva en la translocación del MTOC a la zona de contacto T-APC.

2.1.- AKAP450 y su papel regulador en la reorganización de las integrinas en la sinapsis inmune: posible anclaje del MTOC a la sinapsis inmune.

Durante la migración del linfocito T se produce una reorganización del citoesqueleto de la célula que va acompañada de una reorientación específica de diferentes isoenzimas de PKC a zonas cercanas al MTOC (Volkov et al., 1998), el cual desempeña un papel importante en la determinación de la polaridad de la célula y su movimiento (Montoya et al., 2002). Es en este proceso donde AKAP450 sirve de nucleador de diferentes proteínas en unos macrocomplejos formados por la integrina LFA-1, tales como PKC β and PKC δ (El Din El Homasany et al., 2005), siendo estos complejos esenciales para el desarrollo de un fenotipo migratorio en la célula T. La sobreexpresión de la forma dominante negativa para AKAP450, C-term AKAP450-GFP, provoca que estos macrocomplejos no se formen, impidiendo la interacción entre la integrina LFA-1 y AKAP450. Nuestros resultados demuestran que AKAP450 es necesaria para la organización correcta y la activación de LFA-1 en el contexto de la SI. La sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP tanto en la línea celular Jurkat J77 como en células primarias (linfoblastos T CD4⁺) provoca que el p-SMAC no se organice correctamente en un anillo característico, sino como una agregación pobre e irregular de moléculas de integrinas en la zona de contacto T-APC, colocalizando incluso con las moléculas de CD3 presentes en el c-SMAC. Conjuntamente, estos datos indican un papel de AKAP450 en la organización de la SI, y en concreto el p-SMAC, y como consecuencia se observa que la translocación del MTOC se encuentra impedida en las células que tienen la función de AKAP afectada, ya sea mediante la sobreexpresión de C-term AKAP450-GFP o la interferencia de la proteína endógena. La configuración anómala del p-SMAC observada

podría impedir el anclaje del MTOC a la SI, deslocalizándolo de la zona de contacto. Considerando que el p-SMAC, donde colocalizan las integrinas y la actina, se asocia a los microtúbulos durante la formación de la SI (Kuhn and Poenie, 2002), la posibilidad de que la integrina LFA-1, y quizá otras integrinas asociadas al p-SMAC como VLA-4 (Mittelbrunn et al., 2004), mediante la interacción con AKAP450, pudiera actuar como sitio de anclaje del MTOC es una hipótesis interesante que necesita un mayor estudio. A su vez, nuestros datos muestran una reducción en la activación de LFA-1 determinada mediante anticuerpos capaces de reconocer el cambio conformacional que provoca la activación de las integrinas. Además, se ha observado que aquellas células que poseen la función de AKAP450 afectada tienen un defecto en la fosforilación de PLC γ 1 y PKC θ , sugiriendo un defecto en co-estimulación y señalización de las integrinas en la SI (Kim et al., 2009), lo cual concuerda con la observación de una arquitectura alterada de LFA-1 en el p-SMAC.

2.2.- AKAP450 en el linfocito T: su papel regulador en la activación del linfocito T.

Aparte del papel de AKAP450 que hemos descrito en la organización y posterior activación de las integrinas en la SI, nuestros datos también reflejan un efecto a nivel general en la activación desencadenada a través del complejo CD3/TCR. Además del defecto observado en la fosforilación de PLC γ 1 y PKC θ que puede deberse a la configuración y activación alterada de LFA-1, se observó un defecto en el reclutamiento de PKC θ a la SI en las células que sobreexpresan C-term AKAP450-GFP. Este efecto podría indicar una interacción directa con AKAP450, como previamente se ha descrito con otros miembros de la familia de las PKCs (Takahashi et al., 2000), o, alternativamente, podría resultar del defecto en la activación del complejo TCR/CD3. La translocación de PKC θ a la SI está regulada por numerosas rutas de señalización, aunque es dependiente de PI3K y VAV1 (Villalba et al., 2002), y el defecto en fosforilación de VAV1 que se observa tanto en las células que sobreexpresan el dominante negativo como interferidas para AKAP450 podría explicar dicho defecto en la translocación de PKC θ a la SI.

Se han descrito numerosas moléculas que son reclutadas a la SI a través del MTOC, el aparato de Golgi asociado y otros orgánulos tales como las mitocondrias (Bonello et al., 2004; Sanchez-Madrid and Serrador, 2007). Nuestros datos muestran que AKAP450 ejerce un efecto sobre la polarización del MTOC, similar al que ejercen otras moléculas que hemos comentado a lo largo de este trabajo, como ZAP70 (Blanchard et al., 2002), Fyn (Martin-Cofreces et al., 2006) o el complejo motor dineína/dinactina que se ha descrito anteriormente. Aparte de los defectos comentados anteriormente para la activación de PLC γ 1 y

PKC θ , nuestros datos sugieren que AKAP450 mediante la translocación del MTOC podría estar involucrada en la polarización de otras proteínas de señalización tales como VAV1 y LAT, esenciales para la activación del linfocito T. Se ha descubierto recientemente que la activación local del TCR promueve la acumulación de diacilglicerol (DAG) en la membrana de la célula, lo cual provoca el reclutamiento de dineína a la membrana y la posterior translocación del MTOC (Quann et al., 2009). El bloqueo de la producción de DAG o su deslocalización de la membrana impide la reorientación del MTOC. De este modo, el defecto en la fosforilación de PLC γ 1 que observamos llevaría a un defecto en la producción de DAG y, por tanto, el reclutamiento de la dineína y de la translocación del MTOC, tanto en las células que sobreexpresan C-term AKAP450-GFP como silenciadas para AKAP450. También se ha observado que la deslocalización del MTOC viene acompañada de una menor activación de LAT. Como se ha comentado anteriormente, la fosforilación de LAT es importante para el reclutamiento de las reservas intracelulares de LAT asociadas al MTOC a la SI (Bonello et al., 2004). Nuestros datos sugieren que el efecto de la pérdida de función de AKAP450 en la activación sostenida de LAT podría ser debido a un defecto en el reclutamiento de la fracción de LAT proveniente de las reservas intracelulares, al igual que ocurría cuando afectábamos a la funcionalidad del complejo motor dineína/dinactina.

Por otro lado, la supresión de la función de AKAP450 tiene un efecto negativo en la activación de CD3, observado mediante la reducción significativa de la señal del anticuerpo APA1/1 que reconoce la conformación activa de CD3 ϵ y la menor fosforilación medida por WB de CD3 ζ , sugiriendo la idea de que AKAP450 posee un papel relevante también en la organización y activación del c-SMAC. No obstante, hemos observado que la señalización derivada del TCR no está impedida completamente por la supresión de la función de AKAP450, pudiendo explicar el pequeño porcentaje de células que tanto sobreexpresando C-term AKAP450-GFP como silenciando AKAP450, polarizan correctamente el MTOC a la SI, ya que esa mínima señal inicial pudiera ser suficiente para promover una translocación parcial del MTOC. Junto con el defecto observado en la translocación del MTOC, se ha encontrado un defecto en la polimerización de actina tras estimulación del TCR, lo cual correlaciona con la inactivación de las integrinas y del CD3, indicando un papel de AKAP450 en la activación de las integrinas y en la remodelación del citoesqueleto de la célula T.

Por otro lado, sabemos que AKAP450 actúa como plataforma para la señalización de PKA, y proporciona sitios de anclaje para numerosas proteínas como PP1, PP2A y fosfodiesterasas (Sillibourne et al., 2002; Takahashi et al., 1999). En este contexto, PKA se ha descrito como un regulador negativo de la función adherente de las integrinas durante la quimiotaxis de los

leucocitos (Laudanna et al., 1997). AKAP450 podría estar actuando en diferentes estadios de la activación del linfocito T, inicialmente controlando la configuración y activación de las integrinas y la translocación del MTOC, y posteriormente contribuyendo a la señal de parada y terminación de la SI, ya que contribuiría a través de la señal localizada de PKA a que las integrinas perdieran su capacidad adherente y el conjugado T-APC se separaría.

A parte de su papel en la formación de la SI y en la señalización que se desencadena, AKAP450 podría estar regulando la función y organización del aparato de Golgi. AKAP450 se localiza también en el aparato de Golgi y su papel en la nucleación de microtúbulos podría ser importante para la translocación del complejo MTOC/aparato de Golgi (Rivero et al., 2009), ya que los microtúbulos de nueva síntesis serían los que se anclarían a la zona periférica de la SI. La menor secreción de IL-2 observada en las células con la función de AKAP450 suprimida podría ser debida al fallo en la translocación de dicho complejo a la SI.

En resumen, nuestros datos sugieren que AKAP450 es necesaria para la activación de la célula T a través de la regulación de la conformación activa tanto de las integrinas como del complejo CD3/TCR en la SI, regulando la remodelación del citoesqueleto asociada a la activación del linfocito T.

3.- EL MTOC COMO PLATAFORMA DE SEÑALIZACIÓN ESENCIAL PARA LA ACTIVACIÓN DEL LINFOCITO T.

El centrosoma o centro organizador de microtúbulos (MTOC) se ha observado convencionalmente como un orgánulo estático dentro de la célula, ejerciendo un papel importante en mantener la polaridad de la misma durante la división celular. Sin embargo, en los últimos años, son muchos los trabajos que describen que el MTOC desempeña funciones más específicas dentro de la célula. En este sentido, integrando los diferentes datos de la bibliografía con los nuestros podemos afirmar que el MTOC translocado a la SI constituye una estructura dinámica donde se localizan numerosas proteínas de señalización y adaptadoras que favorecen la comunicación célula-célula, además de controlar la reorganización molecular que se produce en el contacto T-APC que desencadena finalmente la activación del linfocito T.

Esta nueva visión global de la función del MTOC en el linfocito T cuando éste reconoce a la APC y se produce su correcta translocación se representa en el esquema de la **Figura 34A**. Una segunda situación representa el efecto que tiene sobre el linfocito T la pérdida de función

tanto del complejo motor dineína/dinactina como de la proteína adaptadora AKAP450, y la ausencia de translocación del MTOC (**Figura 34B**).

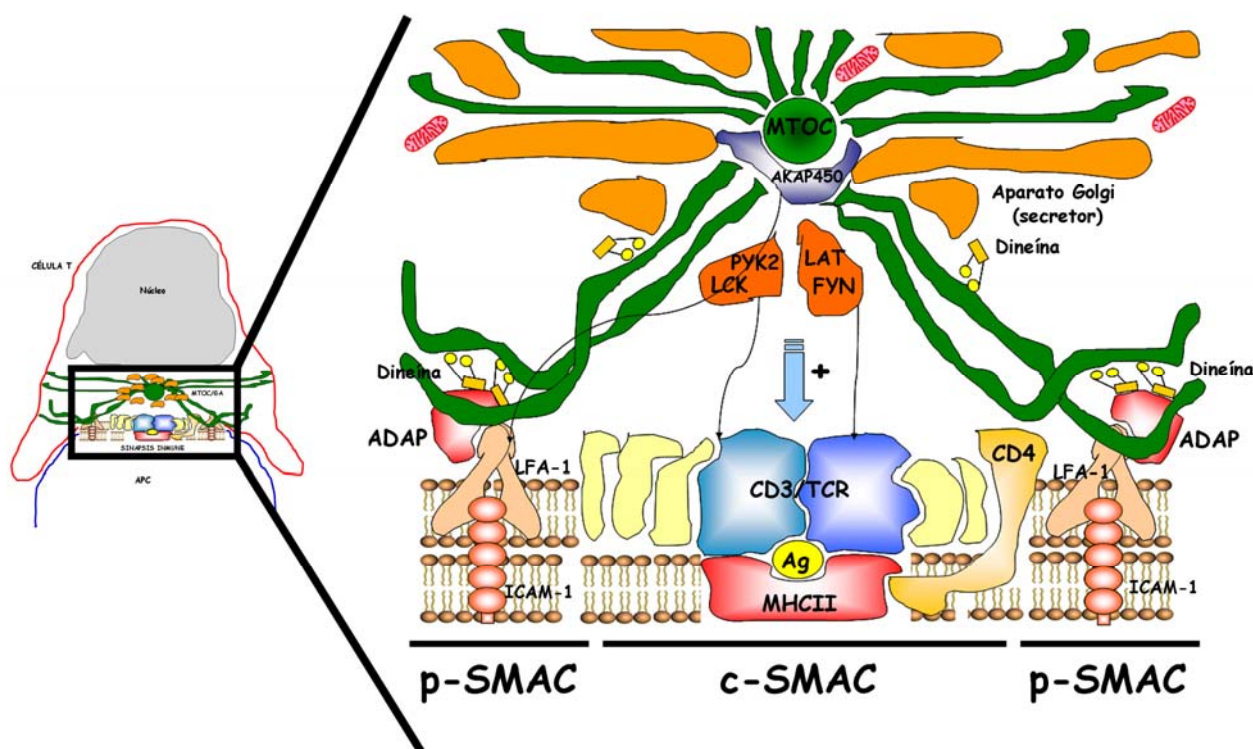


Figura 34: (A) Cuando la célula T reconoce el antígeno presentado por la APC, se produce el reordenamiento de moléculas en la zona de contacto, formándose la SI y la translocación del complejo MTOC/aparato de Golgi a la misma. La translocación del MTOC es mediada a través de la actividad del complejo motor dineína/dinactina al p-SMAC, donde localiza mediante su interacción con ADAP, y desde donde puede arrastrar y dirigir al MTOC. El MTOC translocado madura a través de la síntesis de nuevos microtúbulos que se anclarían al p-SMAC; estos microtúbulos provienen o bien de nuevos complejos γ -TURCs incorporados al centrosoma o bien a través de AKAP450, que promovería la nucleación a través de la proteína GM130 que se encuentra en el Golgi. A su vez, AKAP450 estabiliza el p-SMAC a través de su conexión con la integrina LFA-1 y anclaría firmemente el MTOC a la periferia del contacto, estabilizando finalmente el complejo MTOC/aparato de Golgi, que actuaría como plataforma señalizadora debido a la gran cantidad de moléculas de señalización presentes en ambos orgánulos, además de dirigir toda la maquinaria secretora a la zona de contacto.

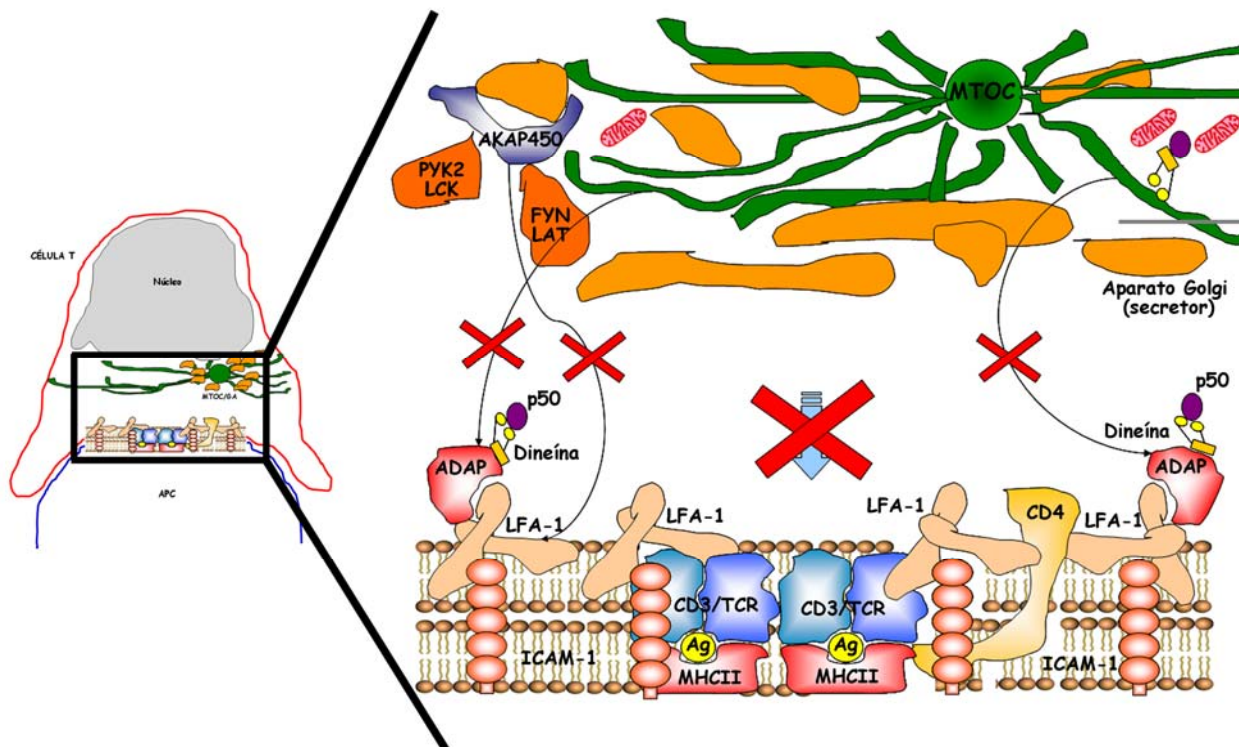


Figura 34: (B) La pérdida de función del complejo motor dineína/dinactina provoca que, a pesar de que los complejos se localicen en la periferia de la célula mediante su interacción con ADAP, no sean capaces de atraer los microtúbulos hacia sí arrastrando al MTOC, con lo que éste no es capaz de llegar a la SI. Además, la pérdida de función de la proteína adaptadora AKAP450 desorganiza a la SI, aparte de impedir un correcto anclaje de los microtúbulos de nueva síntesis al p-SMAC. El fallo en la translocación del MTOC previene que se produzca la maduración completa de la SI debido a que no llegaría un segundo refuerzo de moléculas de señalización, tales como Lck, Fyn, LAT, entre otras, impidiendo finalmente la completa activación del linfocito T.

CONCLUSIONES

1. Los distintos componentes del macrocomplejo motor dineína/dinactina se acumulan en la zona de contacto entre la célula T y la célula presentadora de antígeno. La interferencia de la función y/o expresión del complejo dineína/dinactina no provoca la deslocalización del complejo de la sinapsis inmune pero si impide la correcta translocación del MTOC y el aparato secretor asociado a la zona de contacto T-APC.
2. La interferencia de la función del complejo dineína/dinactina altera la organización de la sinapsis inmune, donde CD3 se acumula en pequeños agregados repartidos a lo largo de toda la sinapsis inmune. Este defecto va asociado a una alteración en la señalización desencadenada tras la activación del TCR, afectando fundamentalmente a la activación de diferentes moléculas de señalización como ZAP70, LAT, VAV1. Como consecuencia, se observa una menor producción de IL-2 por parte del linfocito T, indicando una menor activación del mismo.
3. La proteína adaptadora AKAP450 se localiza en el MTOC y se transloca junto a él a la sinapsis inmune de forma antígeno-específica. La sobreexpresión del dominante negativo para AKAP450 altera la correcta arquitectura del p-SMAC en la sinapsis inmune, afectando a la posición y activación de la integrina LFA-1, así como a la señalización asociada a dicha integrina.
4. La sobreexpresión del dominante negativo para AKAP450 así como el silenciamiento de la proteína provocan una menor activación y fosforilación de diferentes proteínas de señalización como CD3, LAT y VAV1, todas ellas esenciales para la activación del linfocito T.
5. La translocación del MTOC a la sinapsis inmune se encuentra impedida tanto por la sobreexpresión del dominante negativo para AKAP450 como por la interferencia de la proteína, durante la interacción T-APC antígeno-específica. De este modo, también se observa una reducción considerable en la secreción de IL-2 por parte del linfocito T.

BIBLIOGRAFÍA

1. Altman, A., and Villalba, M. (2003). Protein kinase C-theta (PKCtheta): it's all about location, location, location. *Immunol Rev* 192, 53-63.
2. Ardouin, L., Bracke, M., Mathiot, A., Pagakis, S.N., Norton, T., Hogg, N., and Tybulewicz, V.L. (2003). Vav1 transduces TCR signals required for LFA-1 function and cell polarization at the immunological synapse. *Eur J Immunol* 33, 790-797.
3. Badour, K., Zhang, J., and Siminovitch, K.A. (2003). The Wiskott-Aldrich syndrome protein: forging the link between actin and cell activation. *Immunol Rev* 192, 98-112.
4. Batista, A., Millan, J., Mittelbrunn, M., Sanchez-Madrid, F., and Alonso, M.A. (2004). Recruitment of transferrin receptor to immunological synapse in response to TCR engagement. *J Immunol* 172, 6709-6714.
5. Barreiro O, de la Fuente H, Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F (2007). Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev* 218, 147-164.
6. Bauman, A.L., and Scott, J.D. (2002). Kinase- and phosphatase-anchoring proteins: harnessing the dynamic duo. *Nat Cell Biol* 4, E203-206.
7. Billadeau, D.D., and Burkhardt, J.K. (2006). Regulation of cytoskeletal dynamics at the immune synapse: new stars join the actin troupe. *Traffic* 7, 1451-1460.
8. Bischoff, J.R., Anderson, L., Zhu, Y., Mossie, K., Ng, L., Souza, B., Schryver, B., Flanagan, P., Clairvoyant, F., Ginther, C., Chan, C.S., Novotny, M., Slamon, D.J., and Plowman, G.D. (1998). A homologue of *Drosophila* aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. *EMBO J* 17, 3052-3065.
9. Bisel, B., Wang, Y., Wei, J.H., Xiang, Y., Tang, D., Miron-Mendoza, M., Yoshimura, S., Nakamura, N., and Seemann, J. (2008). ERK regulates Golgi and centrosome orientation towards the leading edge through GRASP65. *J Cell Biol* 182, 837-843.
10. Blanchard, N., Di Bartolo, V., and Hivroz, C. (2002). In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity* 17, 389-399.
11. Bonder, E.M., Fishkind, D.J., and Mooseker, M.S. (1983). Direct measurement of critical concentrations and assembly rate constants at the two ends of an actin filament. *Cell* 34, 491-501.

12. Bonello, G., Blanchard, N., Montoya, M.C., Aguado, E., Langlet, C., He, H.T., Nunez-Cruz, S., Malissen, M., Sanchez-Madrid, F., Olive, D., Hivroz, C., and Collette, Y. (2004). Dynamic recruitment of the adaptor protein LAT: LAT exists in two distinct intracellular pools and controls its own recruitment. *J Cell Sci* 117, 1009-1016.
13. Bromley, S.K., Burack, W.R., Johnson, K.G., Somersalo, K., Sims, T.N., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (2001). The immunological synapse. *Annu Rev Immunol* 19, 375-396.
14. Bunnell, S.C., Hong, D.I., Kardon, J.R., Yamazaki, T., McGlade, C.J., Barr, V.A., and Samelson, L.E. (2002). T cell receptor ligation induces the formation of dynamically regulated signaling assemblies. *J Cell Biol* 158, 1263-1275.
15. Bunnell, S.C., Kapoor, V., Tribble, R.P., Zhang, W., and Samelson, L.E. (2001). Dynamic actin polymerization drives T cell receptor-induced spreading: a role for the signal transduction adaptor LAT. *Immunity* 14, 315-329.
16. Burkhardt, J.K., Echeverri, C.J., Nilsson, T., and Vallee, R.B. (1997). Overexpression of the dynamin (p50) subunit of the dynactin complex disrupts dynein-dependent maintenance of membrane organelle distribution. *J Cell Biol* 139, 469-484.
17. Busson, S., Dujardin, D., Moreau, A., Dompierre, J., and De Mey, J.R. (1998). Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr Biol* 8, 541-544.
18. Campi, G., Varma, R., and Dustin, M.L. (2005). Actin and agonist MHC-peptide complex-dependent T cell receptor microclusters as scaffolds for signaling. *J Exp Med* 202, 1031-1036.
19. Cannon, J.L., and Burkhardt, J.K. (2004). Differential roles for Wiskott-Aldrich syndrome protein in immune synapse formation and IL-2 production. *J Immunol* 173, 1658-1662.
20. Colledge, M., and Scott, J.D. (1999). AKAPs: from structure to function. *Trends Cell Biol* 9, 216-221.
21. Combs, J., Kim, S.J., Tan, S., Ligon, L.A., Holzbaur, E.L., Kuhn, J., and Poenie, M. (2006). Recruitment of dynein to the Jurkat immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14883-14888.
22. Corte, G., Moretta, L., Damiani, G., Mingari, M.C., and Bargellesi, A. (1981). Surface antigens specifically expressed by activated T cells in humans. *Eur J Immunol* 11, 162-164.

23. Chang, J.T., Palanivel, V.R., Kinjyo, I., Schambach, F., Intlekofer, A.M., Banerjee, A., Longworth, S.A., Vinup, K.E., Mrass, P., Oliaro, J., Killeen, N., Orange, J.S., Russell, S.M., Weninger, W., and Reiner, S.L. (2007). Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science* 315, 1687-1691.
24. Davis, S.J., and van der Merwe, P.A. (2001). The immunological synapse: required for T cell receptor signalling or directing T cell effector function? *Curr Biol* 11, R289-291.
25. de la Fuente, H., Mittelbrunn, M., Sanchez-Martin, L., Vicente-Manzanares, M., Lamana, A., Pardi, R., Cabanas, C., and Sanchez-Madrid, F. (2005). Synaptic clusters of MHC class II molecules induced on DCs by adhesion molecule-mediated initial T-cell scanning. *Mol Biol Cell* 16, 3314-3322.
26. Delon, J., and Germain, R.N. (2000). Information transfer at the immunological synapse. *Curr Biol* 10, R923-933.
27. Delon, J., Kaibuchi, K., and Germain, R.N. (2001). Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity* 15, 691-701.
28. Dell'Acqua, M.L., Faux, M.C., Thorburn, J., Thorburn, A., and Scott, J.D. (1998). Membrane-targeting sequences on AKAP79 bind phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate. *EMBO J* 17, 2246-2260.
29. Diviani, D., and Scott, J.D. (2001). AKAP signaling complexes at the cytoskeleton. *J Cell Sci* 114, 1431-1437.
30. Dustin, M.L., Olszowy, M.W., Holdorf, A.D., Li, J., Bromley, S., Desai, N., Widder, P., Rosenberger, F., van der Merwe, P.A., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (1998). A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell* 94, 667-677.
31. Echeverri, C.J., Paschal, B.M., Vaughan, K.T., and Vallee, R.B. (1996). Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J Cell Biol* 132, 617-633.
32. Efimov, A., Kharitonov, A., Efimova, N., Loncarek, J., Miller, P.M., Andreyeva, N., Gleeson, P., Galjart, N., Maia, A.R., McLeod, I.X., Yates, J.R., 3rd, Maiato, H., Khodjakov, A., Akhmanova, A., and Kaverina, I. (2007). Asymmetric CLASP-dependent nucleation of noncentrosomal microtubules at the trans-Golgi network. *Dev Cell* 12, 917-930.

33. El Din El Homasany, B.S., Volkov, Y., Takahashi, M., Ono, Y., Keryer, G., Delouree, A., Looby, E., Long, A., and Kelleher, D. (2005). The scaffolding protein CG-NAP/AKAP450 is a critical integrating component of the LFA-1-induced signaling complex in migratory T cells. *J Immunol* 175, 7811-7818.
34. Evans, L., Mitchison, T., and Kirschner, M. (1985). Influence of the centrosome on the structure of nucleated microtubules. *J Cell Biol* 100, 1185-1191.
35. Gillingham, A.K., and Munro, S. (2000). The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin. *EMBO Rep* 1, 524-529.
36. Gomez, T.S., and Billadeau, D.D. (2008). T cell activation and the cytoskeleton: you can't have one without the other. *Adv Immunol* 97, 1-64.
37. Gomez, T.S., Kumar, K., Medeiros, R.B., Shimizu, Y., Leibson, P.J., and Billadeau, D.D. (2007). Formins regulate the actin-related protein 2/3 complex-independent polarization of the centrosome to the immunological synapse. *Immunity* 26, 177-190.
38. Gomez, T.S., McCarney, S.D., Carrizosa, E., Labno, C.M., Comiskey, E.O., Nolz, J.C., Zhu, P., Freedman, B.D., Clark, M.R., Rawlings, D.J., Billadeau, D.D., and Burkhardt, J.K. (2006). HS1 functions as an essential actin-regulatory adaptor protein at the immune synapse. *Immunity* 24, 741-752.
39. Gordón-Alonso, M., Veiga E., and Sanchez-Madrid, F. (2010). Actin dynamics at the immunological synapse. *Cell Health and cytoskeleton* 2, 33-47.
40. Grakoui, A., Bromley, S.K., Sumen, C., Davis, M.M., Shaw, A.S., Allen, P.M., and Dustin, M.L. (1999). The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science* 285, 221-227.
41. Herreros, L., Rodriguez-Fernandez, J.L., Brown, M.C., Alonso-Lebrero, J.L., Cabanas, C., Sanchez-Madrid, F., Longo, N., Turner, C.E., and Sanchez-Mateos, P. (2000). Paxillin localizes to the lymphocyte microtubule organizing center and associates with the microtubule cytoskeleton. *J Biol Chem* 275, 26436-26440.
42. Hook, P., and Vallee, R.B. (2006). The dynein family at a glance. *J Cell Sci* 119, 4369-4371.
43. Houslay, M.D., and Adams, D.R. (2003). PDE4 cAMP phosphodiesterases: modular enzymes that orchestrate signalling cross-talk, desensitization and compartmentalization. *Biochem J* 370, 1-18.

44. Houtman, J.C., Houghtling, R.A., Barda-Saad, M., Toda, Y., and Samelson, L.E. (2005). Early phosphorylation kinetics of proteins involved in proximal TCR-mediated signaling pathways. *J Immunol* 175, 2449-2458.
45. Howell, B.J., McEwen, B.F., Canman, J.C., Hoffman, D.B., Farrar, E.M., Rieder, C.L., and Salmon, E.D. (2001). Cytoplasmic dynein/dynactin drives kinetochore protein transport to the spindle poles and has a role in mitotic spindle checkpoint inactivation. *J Cell Biol* 155, 1159-1172.
46. Huang, J., Tilly, D., Altman, A., Sugie, K., and Grey, H.M. (2000). T-cell receptor antagonists induce Vav phosphorylation by selective activation of Fyn kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10923-10929.
47. Huang, Y., and Burkhardt, J.K. (2007). T-cell-receptor-dependent actin regulatory mechanisms. *J Cell Sci* 120, 723-730.
48. Huang, Y., Norton, D.D., Precht, P., Martindale, J.L., Burkhardt, J.K., and Wange, R.L. (2005). Deficiency of ADAP/Fyb/SLAP-130 destabilizes SKAP55 in Jurkat T cells. *J Biol Chem* 280, 23576-23583.
49. Huse, M., Lillemeier, B.F., Kuhns, M.S., Chen, D.S., and Davis, M.M. (2006). T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat Immunol* 7, 247-255.
50. Hutloff, A., Dittrich, A.M., Beier, K.C., Eljaschewitsch, B., Kraft, R., Anagnostopoulos, I., and Kroczeck, R.A. (1999). ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* 397, 263-266.
51. Ingulli, E., Mondino, A., Khoruts, A., and Jenkins, M.K. (1997). In vivo detection of dendritic cell antigen presentation to CD4(+) T cells. *J Exp Med* 185, 2133-2141.
52. Irvine, D.J., Purbhoo, M.A., Krogsgaard, M., and Davis, M.M. (2002). Direct observation of ligand recognition by T cells. *Nature* 419, 845-849.
53. Karki, S., and Holzbaur, E.L. (1999). Cytoplasmic dynein and dynactin in cell division and intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol* 11, 45-53.
54. Keryer, G., Luo, Z., Cavadore, J.C., Erlichman, J., and Bornens, M. (1993). Phosphorylation of the regulatory subunit of type II beta cAMP-dependent protein kinase by cyclin B/p34cdc2 kinase impairs its binding to microtubule-associated protein 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5418-5422.
55. Keryer, G., Witczak, O., Delougee, A., Kemmner, W.A., Rouillard, D., Tasken, K., and Bornens, M. (2003). Dissociating the centrosomal matrix protein AKAP450

- from centrioles impairs centriole duplication and cell cycle progression. *Mol Biol Cell* 14, 2436-2446.
56. Khodjakov, A., and Rieder, C.L. (2001). Centrosomes enhance the fidelity of cytokinesis in vertebrates and are required for cell cycle progression. *J Cell Biol* 153, 237-242.
 57. Kim, H.S., Takahashi, M., Matsuo, K., and Ono, Y. (2007). Recruitment of CG-NAP to the Golgi apparatus through interaction with dynein-dynactin complex. *Genes Cells* 12, 421-434.
 58. Kim, K., Wang, L., and Hwang, I. (2009). LFA-1-dependent Ca^{2+} entry following suboptimal T cell receptor triggering proceeds without mobilization of intracellular Ca^{2+} . *J Biol Chem* 284, 22149-22154.
 59. Krause, M., Sechi, A.S., Konradt, M., Monner, D., Gertler, F.B., and Wehland, J. (2000). Fyn-binding protein (Fyb)/SLP-76-associated protein (SLAP), Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) proteins and the Arp2/3 complex link T cell receptor (TCR) signaling to the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 149, 181-194.
 60. Krawczyk, C., Oliveira-dos-Santos, A., Sasaki, T., Griffiths, E., Ohashi, P.S., Snapper, S., Alt, F., and Penninger, J.M. (2002). Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity* 16, 331-343.
 61. Krummel, M.F., Sjaastad, M.D., Wulfig, C., and Davis, M.M. (2000). Differential clustering of CD4 and CD3zeta during T cell recognition. *Science* 289, 1349-1352.
 62. Kuhn, J.R., and Poenie, M. (2002). Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity* 16, 111-121.
 63. Kuhne, M.R., Lin, J., Yablonski, D., Mollenauer, M.N., Ehrlich, L.I., Huppa, J., Davis, M.M., and Weiss, A. (2003). Linker for activation of T cells, zeta-associated protein-70, and Src homology 2 domain-containing leukocyte protein-76 are required for TCR-induced microtubule-organizing center polarization. *J Immunol* 171, 860-866.
 64. Kupfer, A., and Dennert, G. (1984). Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol* 133, 2762-2766.

65. Kupfer, A., Dennert, G., and Singer, S.J. (1985). The reorientation of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in the cytotoxic effector cell is a prerequisite in the lysis of bound target cells. *J Mol Cell Immunol* 2, 37-49.
66. Kupfer, A., Mosmann, T.R., and Kupfer, H. (1991). Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 775-779.
67. Kupfer, A., Singer, S.J., Janeway, C.A., Jr., and Swain, S.L. (1987a). Coclustering of CD4 (L3T4) molecule with the T-cell receptor is induced by specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 5888-5892.
68. Kupfer, A., Swain, S.L., and Singer, S.J. (1987b). The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *J Exp Med* 165, 1565-1580.
69. Larocca, M.C., Shanks, R.A., Tian, L., Nelson, D.L., Stewart, D.M., and Goldenring, J.R. (2004). AKAP350 interaction with cdc42 interacting protein 4 at the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell* 15, 2771-2781.
70. Laudanna, C., Campbell, J.J., and Butcher, E.C. (1997). Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants. *J Biol Chem* 272, 24141-24144.
71. Lee, G., Thangavel, R., Sharma, V.M., Litersky, J.M., Bhaskar, K., Fang, S.M., Do, L.H., Andreadis, A., Van Hoesen, G., Ksiezak-Reding, H. (2004). Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 24, 2304-2312.
72. Lee, K.H., Holdorf, A.D., Dustin, M.L., Chan, A.C., Allen, P.M., and Shaw, A.S. (2002). T cell receptor signaling precedes immunological synapse formation. *Science* 295, 1539-1542.
73. Ley, S.C., Marsh, M., Bebbington, C.R., Proudfoot, K., and Jordan, P. (1994). Distinct intracellular localization of Lck and Fyn protein tyrosine kinases in human T lymphocytes. *J Cell Biol* 125, 639-649.
74. Lopez-Lago, M., Lee, H., Cruz, C., Movilla, N., and Bustelo, X.R. (2000). Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav. *Mol Cell Biol* 20, 1678-1691.

75. Lowin-Kropf, B., Shapiro, V.S., and Weiss, A. (1998). Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol* 140, 861-871.
76. Mallik, R., and Gross, S.P. (2004). Molecular motors: strategies to get along. *Curr Biol* 14, R971-982.
77. Mann, M., and Jensen, O.N. (2003). Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat Biotechnol* 21, 255-261.
78. Martin-Cofreces, N.B., Sancho, D., Fernandez, E., Vicente-Manzanares, M., Gordon-Alonso, M., Montoya, M.C., Michel, F., Acuto, O., Alarcon, B., and Sanchez-Madrid, F. (2006). Role of Fyn in the rearrangement of tubulin cytoskeleton induced through TCR. *J Immunol* 176, 4201-4207.
79. Megraw, T.L., Kao, L.R., and Kaufman, T.C. (2001). Zygotic development without functional mitotic centrosomes. *Curr Biol* 11, 116-120.
80. Melkonian, K.A., Maier, K.C., Godfrey, J.E., Rodgers, M., and Schroer, T.A. (2007). Mechanism of dynamitin-mediated disruption of dynactin. *J Biol Chem* 282, 19355-19364.
81. Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.
82. Mittelbrunn, M., Molina, A., Escribese, M.M., Yanez-Mo, M., Escudero, E., Ursa, A., Tejedor, R., Mampaso, F., and Sanchez-Madrid, F. (2004). VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11058-11063.
83. Monks, C.R., Freiberg, B.A., Kupfer, H., Sciaky, N., and Kupfer, A. (1998). Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature* 395, 82-86.
84. Montoya, M.C., Sancho, D., Bonello, G., Collette, Y., Langlet, C., He, H.T., Aparicio, P., Alcover, A., Olive, D., and Sanchez-Madrid, F. (2002a). Role of ICAM-3 in the initial interaction of T lymphocytes and APCs. *Nat Immunol* 3, 159-168.
85. Montoya, M.C., Sancho, D., Vicente-Manzanares, M., and Sanchez-Madrid, F. (2002b). Cell adhesion and polarity during immune interactions. *Immunol Rev* 186, 68-82.

86. Morgan, M.M., Labno, C.M., Van Severter, G.A., Denny, M.F., Straus, D.B., and Burkhardt, J.K. (2001). Superantigen-induced T cell:B cell conjugation is mediated by LFA-1 and requires signaling through Lck, but not ZAP-70. *J Immunol* 167, 5708-5718.
87. Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998). The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6181-6186.
88. Newlon, M.G., Roy, M., Morikis, D., Hausken, Z.E., Coghlan, V., Scott, J.D., and Jennings, P.A. (1999). The molecular basis for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR. *Nat Struct Biol* 6, 222-227.
89. Nieminen, M., Henttinen, T., Merinen, M., Marttila-Ichihara, F., Eriksson, J.E., and Jalkanen, S. (2006). Vimentin function in lymphocyte adhesion and transcellular migration. *Nat Cell Biol* 8, 156-162.
90. Nigg, E.A. (1998). Polo-like kinases: positive regulators of cell division from start to finish. *Curr Opin Cell Biol* 10, 776-783.
91. Nolz, J.C., Gomez, T.S., Zhu, P., Li, S., Medeiros, R.B., Shimizu, Y., Burkhardt, J.K., Freedman, B.D., and Billadeau, D.D. (2006). The WAVE2 complex regulates actin cytoskeletal reorganization and CRAC-mediated calcium entry during T cell activation. *Curr Biol* 16, 24-34.
92. Oakley, C.E., and Oakley, B.R. (1989). Identification of gamma-tubulin, a new member of the tubulin superfamily encoded by mipA gene of *Aspergillus nidulans*. *Nature* 338, 662-664.
93. Ostermann, G., Weber, K.S., Zerneck, A., Schroder, A., and Weber, C. (2002). JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol* 3, 151-158.
94. Palazzo, A.F., Joseph, H.L., Chen, Y.J., Dujardin, D.L., Alberts, A.S., Pfister, K.K., Vallee, R.B., and Gundersen, G.G. (2001). Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr Biol* 11, 1536-1541.
95. Paz, P.E., Wang, S., Clarke, H., Lu, X., Stokoe, D., and Abo, A. (2001). Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem J* 356, 461-471.

96. Peterson, E.J., Woods, M.L., Dmowski, S.A., Derimanov, G., Jordan, M.S., Wu, J.N., Myung, P.S., Liu, Q.H., Pribila, J.T., Freedman, B.D., Shimizu, Y., and Koretzky, G.A. (2001). Coupling of the TCR to integrin activation by Slap-130/Fyb. *Science* 293, 2263-2265.
97. Pfister, K.K., Fisher, E.M., Gibbons, I.R., Hays, T.S., Holzbaur, E.L., McIntosh, J.R., Porter, M.E., Schroer, T.A., Vaughan, K.T., Witman, G.B., King, S.M., and Vallee, R.B. (2005). Cytoplasmic dynein nomenclature. *J Cell Biol* 171, 411-413.
98. Purohit, A., Tynan, S.H., Vallee, R., and Doxsey, S.J. (1999). Direct interaction of pericentrin with cytoplasmic dynein light intermediate chain contributes to mitotic spindle organization. *J Cell Biol* 147, 481-492.
99. Quann, E.J., Merino, E., Furuta, T., and Huse, M. (2009). Localized diacylglycerol drives the polarization of the microtubule-organizing center in T cells. *Nat Immunol* 10, 627-635.
100. Rios, R.M., Sanchis, A., Tassin, A.M., Fedriani, C., and Bornens, M. (2004). GMAP-210 recruits gamma-tubulin complexes to cis-Golgi membranes and is required for Golgi ribbon formation. *Cell* 118, 323-335.
101. Risueno, R.M., Gil, D., Fernandez, E., Sanchez-Madrid, F., and Alarcon, B. (2005). Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses. *Blood* 106, 601-608.
102. Rivero, S., Cardenas, J., Bornens, M., and Rios, R.M. (2009). Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J* 28, 1016-1028.
103. Ryser, J.E., Rungger-Brandle, E., Chaponnier, C., Gabbiani, G., and Vassalli, P. (1982). The area of attachment of cytotoxic T lymphocytes to their target cells shows high motility and polarization of actin, but not myosin. *J Immunol* 128, 1159-1162.
104. Sampath, R., Gallagher, P.J., and Pavalko, F.M. (1998). Cytoskeletal interactions with the leukocyte integrin beta2 cytoplasmic tail. Activation-dependent regulation of associations with talin and alpha-actinin. *J Biol Chem* 273, 33588-33594.
105. Sanchez-Madrid, F., Nagy, J.A., Robbins, E., Simon, P., and Springer, T.A. (1983). A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the

- C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J Exp Med* 158, 1785-1803.
106. Sánchez-Martín, L., Sánchez-Sánchez, N., Gutiérrez-López, MD., Rojo, AI., Vicente-Manzanares, M., Pérez-Alvarez, MJ., Sánchez-Mateos, P., Bustelo, XR., Cuadrado, A., Sánchez-Madrid, F., Rodríguez-Fernández, JL., Cabañas, C. (2004). Signaling through the leukocyte integrin LFA-1 in T cells induces a transient activation of Rac-1 that is regulated by Vav and PI3K/Akt-1. *J Biol Chem* 279, 16194-16205.
 107. Sancho, D., Vicente-Manzanares, M., Mittelbrunn, M., Montoya, M.C., Gordon-Alonso, M., Serrador, J.M., and Sanchez-Madrid, F. (2002). Regulation of microtubule-organizing center orientation and actomyosin cytoskeleton rearrangement during immune interactions. *Immunol Rev* 189, 84-97.
 108. Savoian, M.S., Goldberg, M.L., and Rieder, C.L. (2000). The rate of poleward chromosome motion is attenuated in *Drosophila* zw10 and rod mutants. *Nat Cell Biol* 2, 948-952.
 109. Schmidt, P.H., Dransfield, D.T., Claudio, J.O., Hawley, R.G., Trotter, K.W., Milgram, S.L., and Goldenring, J.R. (1999). AKAP350, a multiply spliced protein kinase A-anchoring protein associated with centrosomes. *J Biol Chem* 274, 3055-3066.
 110. Schroer, T.A., and Sheetz, M.P. (1991). Two activators of microtubule-based vesicle transport. *J Cell Biol* 115, 1309-1318.
 111. Segal, M., and Bloom, K. (2001). Control of spindle polarity and orientation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends Cell Biol* 11, 160-166.
 112. Serrador, J.M., Cabrero, J.R., Sancho, D., Mittelbrunn, M., Urzainqui, A., and Sanchez-Madrid, F. (2004). HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity* 20, 417-428.
 113. Sharp, D.J., Rogers, G.C., and Scholey, J.M. (2000). Cytoplasmic dynein is required for poleward chromosome movement during mitosis in *Drosophila* embryos. *Nat Cell Biol* 2, 922-930.
 114. Sillibourne, J.E., Milne, D.M., Takahashi, M., Ono, Y., and Meek, D.W. (2002). Centrosomal anchoring of the protein kinase CK1delta mediated by attachment to

- the large, coiled-coil scaffolding protein CG-NAP/AKAP450. *J Mol Biol* 322, 785-797.
115. Smith, F.D., Langeberg, L.K., and Scott, J.D. (2006). The where's and when's of kinase anchoring. *Trends Biochem Sci* 31, 316-323.
 116. Stinchcombe, J.C., Majorovits, E., Bossi, G., Fuller, S., and Griffiths, G.M. (2006). Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature* 443, 462-465.
 117. Stowers, L., Yelon, D., Berg, L.J., and Chant, J. (1995). Regulation of the polarization of T cells toward antigen-presenting cells by Ras-related GTPase CDC42. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5027-5031.
 118. Sutherland, E.W. (1972). Studies on the mechanism of hormone action. *Science* 177, 401-408.
 119. Sutterlin, C., and Colanzi, A. (2010). The Golgi and the centrosome: building a functional partnership. *J Cell Biol* 188, 621-628.
 120. Sutterlin, C., Polishchuk, R., Pecot, M., and Malhotra, V. (2005). The Golgi-associated protein GRASP65 regulates spindle dynamics and is essential for cell division. *Mol Biol Cell* 16, 3211-3222.
 121. Takahashi, M., Mukai, H., Oishi, K., Isagawa, T., and Ono, Y. (2000). Association of immature hypophosphorylated protein kinase cepsilon with an anchoring protein CG-NAP. *J Biol Chem* 275, 34592-34596.
 122. Takahashi, M., Shibata, H., Shimakawa, M., Miyamoto, M., Mukai, H., and Ono, Y. (1999). Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the golgi apparatus. *J Biol Chem* 274, 17267-17274.
 123. Tasken, K.A., Collas, P., Kemmner, W.A., Witczak, O., Conti, M., and Tasken, K. (2001). Phosphodiesterase 4D and protein kinase a type II constitute a signaling unit in the centrosomal area. *J Biol Chem* 276, 21999-22002.
 124. Thyberg, J., and Moskalewski, S. (1999). Role of microtubules in the organization of the Golgi complex. *Exp Cell Res* 246, 263-279.
 125. Turner, M., and Billadeau, D.D. (2002). VAV proteins as signal integrators for multi-subunit immune-recognition receptors. *Nat Rev Immunol* 2, 476-486.
 126. Tybulewicz, V.L. (2005). Vav-family proteins in T-cell signalling. *Curr Opin Immunol* 17, 267-274.

127. Valitutti, S., Dessing, M., Aktories, K., Gallati, H., and Lanzavecchia, A. (1995). Sustained signaling leading to T cell activation results from prolonged T cell receptor occupancy. Role of T cell actin cytoskeleton. *J Exp Med* 181, 577-584.
128. Valitutti, S., Muller, S., Salio, M., and Lanzavecchia, A. (1997). Degradation of T cell receptor (TCR)-CD3-zeta complexes after antigenic stimulation. *J Exp Med* 185, 1859-1864.
129. Vallee, R.B., and Stehman, S.A. (2005). How dynein helps the cell find its center: a servomechanical model. *Trends Cell Biol* 15, 288-294.
130. Vallee, R.B., Williams, J.C., Varma, D., and Barnhart, L.E. (2004). Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J Neurobiol* 58, 189-200.
131. Vaughan, K.T. (2005). Microtubule plus ends, motors, and traffic of Golgi membranes. *Biochim Biophys Acta* 1744, 316-324.
132. Vaughan, K.T., and Vallee, R.B. (1995). Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *J Cell Biol* 131, 1507-1516.
133. Vaughan, P.S., Leszyk, J.D., and Vaughan, K.T. (2001). Cytoplasmic dynein intermediate chain phosphorylation regulates binding to dynactin. *J Biol Chem* 276, 26171-26179.
134. Vicente-Manzanares, M., and Sanchez-Madrid, F. (2004). Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol* 4, 110-122.
135. Villalba, M., Bi, K., Hu, J., Altman, Y., Bushway, P., Reits, E., Neefjes, J., Baier, G., Abraham, R.T., and Altman, A. (2002). Translocation of PKC[theta] in T cells is mediated by a nonconventional, PI3-K- and Vav-dependent pathway, but does not absolutely require phospholipase C. *J Cell Biol* 157, 253-263.
136. Wang, H., McCann, F.E., Gordan, J.D., Wu, X., Raab, M., Malik, T.H., Davis, D.M., and Rudd, C.E. (2004). ADAP-SLP-76 binding differentially regulates supramolecular activation cluster (SMAC) formation relative to T cell-APC conjugation. *J Exp Med* 200, 1063-1074.
137. Williams, R.O. (2002). Cutting edge: A-kinase anchor proteins are involved in maintaining resting T cells in an inactive state. *J Immunol* 168, 5392-5396.
138. Witczak, O., Skalhegg, B.S., Keryer, G., Bornens, M., Tasken, K., Jahnsen, T., and Orstavik, S. (1999). Cloning and characterization of a cDNA encoding an A-

- kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450. *EMBO J* 18, 1858-1868.
- 139.** Wulfig, C., Bauch, A., Crabtree, G.R., and Davis, M.M. (2000). The vav exchange factor is an essential regulator in actin-dependent receptor translocation to the lymphocyte-antigen-presenting cell interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10150-10155.
- 140.** Yokosuka, T., Sakata-Sogawa, K., Kobayashi, W., Hiroshima, M., Hashimoto-Tane, A., Tokunaga, M., Dustin, M.L., and Saito, T. (2005). Newly generated T cell receptor microclusters initiate and sustain T cell activation by recruitment of Zap70 and SLP-76. *Nat Immunol* 6, 1253-1262.
- 141.** Zeng, R., Cannon, J.L., Abraham, R.T., Way, M., Billadeau, D.D., Bubeck-Wardenberg, J., and Burkhardt, J.K. (2003). SLP-76 coordinates Nck-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein recruitment with Vav-1/Cdc42-dependent Wiskott-Aldrich syndrome protein activation at the T cell-APC contact site. *J Immunol* 171, 1360-1368.
- 142.** Zheng, Y., Wong, M.L., Alberts, B., and Mitchison, T. (1995). Nucleation of microtubule assembly by a gamma-tubulin-containing ring complex. *Nature* 378, 578-583.

ANEXO I

Texto suplementario

Vídeo 1 - Dineína/Dinactina (M1) y Vídeo 2 - AKAP450 (M2)

La translocación del MTOC ocurre de manera inmediata a la formación del conjugado T-APC. El MTOC se mueve a la zona de contacto con la APC en los primeros 5 minutos en aquellas células J77 que sobreexpresan paxilina-GFP (verde). Las células Raji cargadas con SEE actúan como APCs, marcadas con la sonda roja CMCTR. Las células se mantuvieron en HBSS (2% BSA) a 37°C (5% CO₂). Se adquirieron 6 secciones ópticas mediante microscopía confocal que se proyectaron en una sola imagen, cada 30 segundos durante más de 30 minutos. El tiempo se muestra en segundos. Las barras equivalen a 10 µm.

Vídeo 2 - Dineína/Dinactina (M2)

La sobreexpresión de p50-dinamitina-GFP impide el correcto movimiento del MTOC a la sinapsis inmune. El movimiento del MTOC a la zona de contacto T-APC no se observa en los clones de células J77 que sobreexpresan p50-GFP. Las condiciones son las mismas que en los anteriores vídeos.

Vídeo 1 - AKAP450 (M1)

La translocación del MTOC se impide cuando se sobreexpresa el dominante negativo de AKAP450. El movimiento del MTOC a la sinapsis inmune no se observa en las células J77 que sobreexpresan C-term AKAP450-GFP (verde). Las condiciones son las mismas que en los anteriores vídeos.

ANEXO II

Artículos publicados

- ✓ Noa B. Martín-Cófreces, **Javier Robles-Valero**, J. Román Cabrero, María Mittelbrunn, Mónica Gordón-Alonso, Richard B. Vallee, Ching-Hwa Sung, Balbino Alarcón, Jesús Vázquez and Francisco Sánchez-Madrid. **MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signalling.** *The Journal of Cell Biology* (JCB), 2008. Cited by DOI: 10.1083/jcb.200801014.

- ✓ **Javier Robles-Valero**, Noa B. Martín-Cófreces, Amalia Lamana, Stephen Macdonald, Yuri Volkov and Francisco Sánchez-Madrid. **Integrin and CD3/TCR activation are regulated by the scaffold protein AKAP450.** *Blood*, 2010. Cited by DOI: 10.1182/blood-2009-12-256222.

- ✓ Carmen Calabia-Linares, **Javier Robles-Valero**, Hortensia de la Fuente, Manuel Perez-Martinez, Noa Martín-Cofreces, Manuel Alfonso-Pérez, Cristina Gutierrez-Vázquez, María Mittelbrunn, Sales Ibiza, Francisco R. Urbano-Olmos, Covadonga Aguado-Ballano, Carlos Oscar Sánchez-Sorzano, Francisco Sanchez-Madrid and Esteban Veiga. **Clathrin drives actin accumulation at the immunological synapse.** En revisión en *Journal of Cell Science* (JCS).

ANEXO III

Artículos de la tesis

- ✓ Noa B. Martín-Cófreces, **Javier Robles-Valero**, J. Román Cabrero, María Mittelbrunn, Mónica Gordón-Alonso, Richard B. Vallee, Ching-Hwa Sung, Balbino Alarcón, Jesús Vázquez and Francisco Sánchez-Madrid. **MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signalling.** *The Journal of Cell Biology* (JCB), 2008. Cited by DOI: 10.1083/jcb.200801014.

- ✓ **Javier Robles-Valero**, Noa B. Martín-Cófreces, Amalia Lamana, Stephen Macdonald, Yuri Volkov and Francisco Sánchez-Madrid. **Integrin and CD3/TCR activation are regulated by the scaffold protein AKAP450.** *Blood*, 2010. Cited by DOI: 10.1182/blood-2009-12-256222.

MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling

Noa B. Martín-Cófreces,¹ Javier Robles-Valero,¹ J. Román Cabrero,¹ María Mittelbrunn,^{1,2} Mónica Gordón-Alonso,¹ Ching-Hwa Sung,³ Balbino Alarcón,⁴ Jesús Vázquez,⁴ and Francisco Sánchez-Madrid^{1,2}

¹Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, 28006 Madrid, Spain

²Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, 28029 Madrid, Spain

³Dyson Vision Research Institute, Weill Medical College of Cornell University, New York, NY 10021

⁴Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, 28049 Madrid, Spain

The translocation of the microtubule-organizing center (MTOC) toward the nascent immune synapse (IS) is an early step in lymphocyte activation initiated by T cell receptor (TCR) signaling. The molecular mechanisms that control the physical movement of the lymphocyte MTOC remain largely unknown. We have studied the role of the dynein–dynactin complex, a microtubule-based molecular motor, in the process of T cell activation during T cell antigen–presenting cell cognate immune interactions. Impairment of dynein–dynactin complex activity, either by overexpressing the p50-dynamitin component of dynactin to disrupt the

complex or by knocking down dynein heavy chain expression to prevent its formation, inhibited MTOC translocation after TCR antigen priming. This resulted in a strong reduction in the phosphorylation of molecules such as ζ chain–associated protein kinase 70 (ZAP70), linker of activated T cells (LAT), and Vav1; prevented the supply of molecules to the IS from intracellular pools, resulting in a disorganized and dysfunctional IS architecture; and impaired interleukin-2 production. Together, these data reveal MTOC translocation as an important mechanism underlying IS formation and sustained T cell signaling.

Introduction

T cell activation is achieved through the presentation of a specific antigen by an antigen-presenting cell (APC). This process involves the formation of a specialized structure (the immune synapse [IS]) at the T cell–APC contact site. Upon T cell receptor (TCR) activation by antigen recognition, the T cell molecules involved in the formation of the IS reorganize to form this highly segregated structure (Dustin et al., 1998). The TCR and associated molecules congregate in the central area (central supramolecular activation cluster [cSMAC]), whereas adhesion receptors reorganize in a surrounding external ring called the peripheral SMAC (pSMAC; Monks et al., 1998). This differential distribution has been shown to be necessary for full T cell activation (Grakoui et al., 1999) and allows the spatiotemporal

regulation of signaling pathways emanating from the IS (Lee et al., 2003). As part of this process, the T cell cytoskeleton reorganizes in order to provide a physical platform to support the IS structure. The actin cytoskeleton forms a ring superimposed on the pSMAC, whereas the tubulin cytoskeleton is vectorially directed toward the center of the IS, where the microtubule-organizing center (MTOC) translocates (Ryser et al., 1982; Kupfer et al., 1987; Kupfer and Singer, 1989). The role of the actin cytoskeleton in T cell activation has been widely studied, and its remodeling upon TCR engagement is required for full T cell activation (Das et al., 2002; Vicente-Manzanares and Sanchez-Madrid, 2004; Billadeau et al., 2007).

The reorganization of the tubulin cytoskeleton has also been found to be important for MTOC translocation and T cell effector functions. The vectorial movement of the MTOC toward the IS is readily observed upon antigen-specific TCR engagement (Sancho et al., 2002b), bringing the secretory apparatus (Golgi) into close apposition to the APC, and thereby

Correspondence to F. Sánchez-Madrid: fsanchez.hlpr@salud.madrid.org

Abbreviation used in this paper: ADAP, adhesion and degranulation promoting adapter protein; APC, antigen-presenting cell; CMAC, 7-amino-4-chloromethyl-coumarin; cSMAC, central SMAC; CTL, cytotoxic T lymphocytes; DHC, dynein heavy chain; FN, fibronectin; IL-2, interleukin-2; IS, immune synapse; LAT, linker of activated T cells; LFA-1, lymphocyte function–associated antigen 1; MTOC, microtubule-organizing center; PLL, poly-L-lysine; pSMAC, peripheral SMAC; SEB, *Staphylococcus aureus* enterotoxin B; SEE, *Staphylococcus aureus* enterotoxin E; SMAC, supramolecular activation cluster; TCR, T cell receptor; ZAP70, ζ chain–associated protein kinase 70.

The online version of this paper contains supplemental material.

© 2008 Martín-Cófreces et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.jcb.org/misc/terms.shtml>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported license, as described at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/>).

providing the basis for polarized secretion (Kupfer and Dennert, 1984; Kupfer et al., 1991). Moreover, MTOC translocation has been shown to be essential for normal cell function in cytotoxic T lymphocytes' (CTL) killing of target cells (Kupfer et al., 1985). More recently, it has been shown that the secretory granules that contain the effector proteins for cell killing move toward the translocated MTOC, promoting an efficient target clearance by CTL (Stinchcombe et al., 2006). However, to date there have been no published studies providing a clear-cut demonstration of a relationship between MTOC translocation and T cell activation.

Among the candidate signaling molecules involved in MTOC translocation are members of the src tyrosine kinase family such as Lck and Fyn (Lowin-Kropf et al., 1998; Sedwick et al., 1999; Martin-Cofreces et al., 2006). Other signaling and adaptor molecules associated with TCR-specific signaling, such as ζ chain-associated protein kinase 70 (ZAP70), SLP76, and adhesion and degranulation promoting adapter protein (ADAP)/Fyb/SLAP130, are also required for MTOC translocation in T cells (Lowin-Kropf et al., 1998; Blanchard et al., 2002; Barreiro et al., 2007). CD2AP, an adaptor protein essential for CD2 clustering and segregation at the IS, is also necessary for MTOC translocation (Dustin et al., 1998). Interestingly, CD2AP-deficient T cells show deficient segregation of lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) and TCR at the IS (Lee et al., 2003).

Despite these advances, the molecular mechanisms that drive MTOC translocation during T cell activation remain largely unknown. Recently, the dynein intermediate chain has been identified as part of a protein complex with ADAP that localizes at the pSMAC in the IS (Combs et al., 2006). Dynein possesses microtubule minus-end motor activity, and multimolecular dynein–dynactin complexes have been implicated in the positioning of the MTOC at the leading edge of migrating fibroblasts and epithelial cells (Palazzo et al., 2001). Full functioning of dynein requires the activity of dynactin (King et al., 2003; Ross et al., 2006). These molecular complexes are linked through the interaction of the p150-glued subunit of dynactin and the p74 dynein intermediate chain (Vaughan and Vallee, 1995). Dynein–dynactin complexes can carry a variety of cargoes by combining different light intermediate chains and light chains. Among the components of this multisubunit complex, the p50-dynamitin subunit can prevent dynein–dynactin complex activity (Hirokawa, 1998; Vaughan, 2005). Recently, in vitro experimentation has revealed that the presence of an excess of exogenous dynamitin leads to the destabilization of the dynactin shoulder structure formed by p150-glued and p24 subunits, which causes their disassembly from dynactin complex (Melkonian et al., 2007). In some cell processes, p50-dynamitin-GFP overexpression might not prevent microtubule minus-end directed movement. This is the case with the intracellular reorientation toward the MTOC of *Chlamydia trachomatis* particles, despite the fact that dynein and dynactin colocalize in nascent *C. trachomatis* inclusions and the movement is dynein dependent (Grieshaber et al., 2003). This effect could be explained by a dynactin-independent dynein function.

We have investigated the role of the dynein–dynactin complex in MTOC translocation upon antigen- and superantigen-driven

TCR activation in Jurkat and CH7C17 T cells. Different dynein and dynactin subunits, such as p150 and p74, are enriched at the IS upon stimulation with antigen or superantigen. MTOC translocation was impaired by stable overexpression of a p50-dynamitin-GFP construct or by dynein heavy chain (DHC) silencing. Moreover, expression of p50-dynamitin-GFP altered the segregation of CD3 at the IS central cluster and of LFA-1 at the pSMAC, with subsequent disturbance in the activation of signaling proteins such as ZAP70, linker of activated T cells (LAT), and Vav1. These data highlight the importance of dynein–dynactin complex activity in MTOC translocation and the transduction of TCR signals after antigen stimulation.

Results

Inhibition of dynein–dynactin activity impairs MTOC translocation at the T cell–APC contact area

To study the molecular mechanisms that rearrange the tubulin cytoskeleton and translocate the MTOC to the contact area with the antigen presenting cell, we determined the localization of dynein–dynactin complex components in conjugates formed between two different cell pairs: J77 Jurkat T cells bearing a V β 8-containing TCR, conjugated to *Staphylococcus aureus* enterotoxin E (SEE)-pulsed Raji APC; and CH7C17 T cells bearing a V β 3-containing TCR specific for HA peptide, conjugated to HA peptide- or *S. aureus* enterotoxin B (SEB)-pulsed Hom2 APC (not depicted). Cells were labeled with specific antibodies against the p74 dynein subunit, which was mainly enriched at tubulin-based cytoskeletal structures. Similar localization patterns were observed for the p50-dynamitin subunit (Echeverri et al., 1996), and for p150-glued, the component of the dynactin complex that mediates interaction with dynein (Figs. 1 and S1, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200801014/DC1>; Vaughan and Vallee, 1995).

In most J77-Raji or CH7C17-Hom2 conjugates, the MTOC was located in the contact area between the T cell and the APC (arrows in Fig. 1, A and B; see also the Z maximal projections in Fig. S1, A and B). The components of the dynein–dynactin complex (p150, p50, and p74) were detected at the reoriented MTOC and were highly enriched at the tubulin cytoskeleton localized close to the membrane of the contact area (Fig. 1, A and B; z projections in Fig. S1, A–C), which corresponds with the periphery of the T-APC contact area. We further analyzed the behavior of dynactin components in GFP-Jurkat cells that were conjugated to SEE-pulsed Raji cells and fixed shortly afterward (3 min). Before reorientation of the MTOC, there was an initial clustering of p150-glued and p50-dynamitin subunits at the cell–cell contact area (Fig. S1 C). Subsequently, in cells fixed 20 min after conjugation, major clustering of dynactin subunits was observed at the IS together with MTOC translocation (Fig. S1 C).

To assess whether the dynein–dynactin complex is functionally involved in MTOC reorientation, we generated J77 cell clones that express levels of p50-dynamitin coupled to GFP similar to those of the endogenous protein (Fig. S2, A and B, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200801014/DC1>). We found that the binding of the dynein p74 intermediate chain

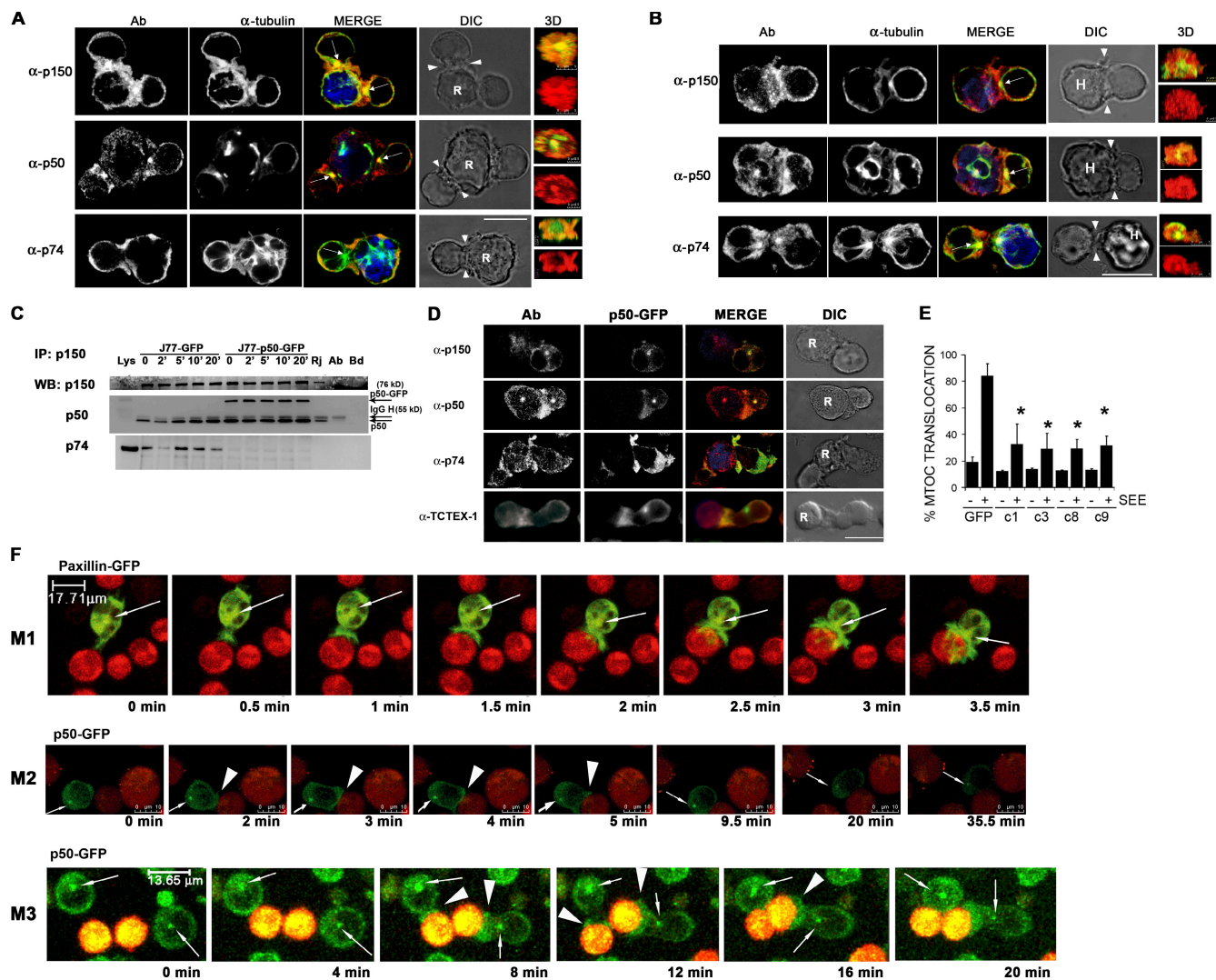


Figure 1. Overexpression of p50-dynamin-GFP impairs MTOC translocation upon TCR stimulation. (A and B) Dynein–dynactin components are found at the contact area between T and APC. The conjugates of J77 Jurkat T cells and SEE-pulsed Raji APC (A) or CH7C17 T cells and HA-pulsed Hom2 APC (B) were fixed with paraformaldehyde. Raji (R) and Hom2 (H) APC were CMAC-labeled (blue). Dynein–dynactin components were detected with specific antibodies (Ab; α -p150, p150-glued; α -p50, p50-dynamin; α -p74, p74 dynein intermediate chain, clone 74.1) followed by Alexa 568-labeled anti-mouse secondary antibody (red in merged images). α -tubulin was detected with FITC-labeled antibody (green). Confocal z slices and corresponding 3D reconstructions of SMAC area (right) are shown (arrowheads in the z slice mark the cell–cell junction selected for 3D projection; arrows indicate MTOC). Bars, 10 μ m. (C) p50-dynamin-GFP overexpression prevents dynein–dynactin complex formation upon TCR stimulation. p150-glued was immunoprecipitated (IP) from J77 Jurkat cells overexpressing GFP (J77-GFP) or p50-dynamin-GFP (J77-p50-GFP), then left unstimulated or stimulated by SEE during the indicated times. Samples were processed by Western blotting (WB) using the indicated antibodies. Arrows indicate positions of endogenous (50 kD) and GFP-tagged p50 (76 kD) and IgG H (55 kD). Ab, immunoprecipitating antibody; Bd, G-agarose-coupled beads; Lys, whole lysate; Rj, Raji cells. (D) Dynein–dynactin components cluster at IS in dynamin-disrupted cells. Conjugates of dynamin-disrupted Jurkat T cell clones and SEE-pulsed Raji APC (CMAC-labeled, blue) were processed as in A. GFP is shown in green. Bar, 10 μ m. (E) Quantification of MTOC translocation in SEE-stimulated dynamin-disrupted clones (c1, c3, c8, and c9) and GFP control cells. A total of 600 conjugates were counted from five independent experiments. Data are means \pm SD. *, $P < 0.05$ versus GFP (Student's t test). (F) Time-lapse confocal video microscopy sequence showing the dynamics of MTOC movement in Jurkat cells overexpressing paxillin-GFP (green, control) or p50-dynamin-GFP (green) at the indicated times. MTOC translocation was stimulated with SEE-pulsed Raji APC loaded with CMCTR cell tracker (red/orange). Images were captured at 37°C. Arrows indicate the position of the MTOC; arrowheads indicate T cell ISs. M, movie.

to dynactin p150-glued in T lymphocytes changes rapidly upon SEE stimulation. There is a transient decrease in this molecular association at short times (0–2 min; Fig. 1 C, J77-GFP), but the binding is recovered shortly after (5–20 min; Fig. 1 C, J77-p50-GFP). Exogenous p50-dynamin exerted an inhibitory role on the dynein–dynactin complex by preventing the interaction of dynein p74 with the dynactin component p150-glued (Fig. 1 C, J77-p50-GFP). We obtained four dynamin-disrupted clones, which behaved identically and were used indistinctly in sub-

sequent experiments. Expression of p50-dynamin-GFP protein (Fig. S2 A) did not interfere with cell viability (unpublished data), and the GFP construct was stable in the cell, showing no sign of degradation as determined by Western blotting (Fig. S2 B). The p50-dynamin-GFP protein showed a similar distribution to endogenous p50 and p150-glued (Fig. 1 D).

We next assessed the behavior of dynein–dynactin complex components, the MTOC, and the associated Golgi apparatus when the T clones were stimulated with SEE-pulsed Raji cells. In all

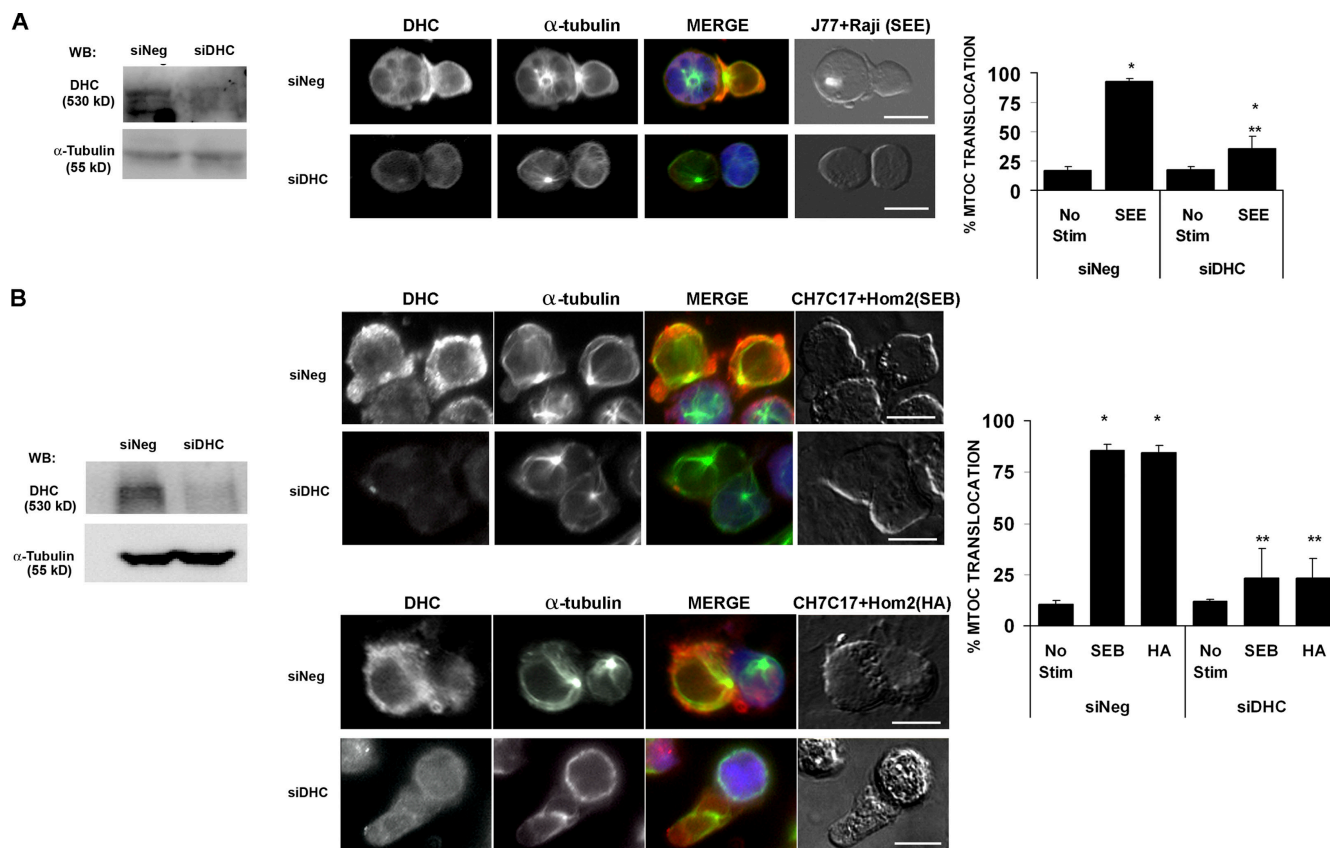


Figure 2. DHC RNA interference prevents MTOC translocation. Jurkat cells (A) and CH7C17 cells (B). (left) The effect of DHC siRNA expression (siDHC). DHC was detected by Western blotting with anti-DHC goat polyclonal antibody. (middle) In control cells (siNeg), DHC is localized at the periphery of the IS, surrounding the MTOC. This accumulation does not occur in DHC-interfered cells (siDHC), which fail to translocate their MTOC. Conjugates were formed as in Fig. 1. DHC was detected with anti-DHC clone 440, followed by Alexa 568-labeled anti-mouse secondary antibody (red in the merge image). Tubulin was detected as in Fig. 1 (green). SEE-pulsed Raji and HA or SEB-pulsed Hom2 APC are blue in the merged image (CMAC-labeled). Differential interference contrast images are shown on the right. Bars, 10 μ m. (far right) Quantification of MTOC translocation in conjugated Jurkat (A) or CH7C17 (B) T cells. More than 200 conjugates were counted for each condition. Data are means \pm SD. *, $P < 0.05$ versus no stimulation; **, $P < 0.001$ versus siNeg (Student's *t* test).

four dynamitin-disrupted clones, MTOC translocation to the contact area with the Raji cell was defective (Fig. 1, D and E). The dynein–dynactin components p150–glued, p74, and TCTEX-1 were localized both at the untranslocated MTOC and at the cell–cell contact area (Fig. 1 D). p50-dynamitin-GFP was also detected at the T cell contact zone, which suggests that the defective MTOC translocation might be the result of a local inhibition of the dynein–dynactin complex (Fig. 1, D and F, arrowheads in M2 and M3; and Videos 2 and 3, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200801014/DC1>). The impaired MTOC translocation observed in dynamitin-disrupted T cells might be caused by a failure to relocalize toward the APC, or, alternatively, there might be a defect in anchorage once the MTOC reaches the cell-to-cell contact area. To investigate this, we monitored the movement of the MTOC in J77 T cells by time-lapse confocal videomicroscopy, starting from the initial contact with the SEE-prepulsed Raji cells. MTOC movement in the dynamitin-disrupted clones was either random or not evident, showing no effective rearrangement toward the IS (Fig. 1 F, arrows in M2 and M3; and Videos 2 and 3). In contrast, in control cells overexpressing a paxillin-GFP construct (Herreros et al., 2000), the MTOC moved directly to the IS within the first 2–5 min (Fig. 1 F, arrows in M1; and Video 1).

Therefore, in all clones and at all SEE doses, the p50-dynamitin-GFP construct was clustered at the plasma membrane in the T cell contact area with the APC (Fig. 1 D and F, arrowheads in M2 and M3; Videos 2 and 3; and not depicted), which is in accordance with the localization of p74 and p150. However, p74 and p150 interaction was not detected in these conditions. These data strongly support the involvement of the dynactin complex in MTOC translocation, in cooperation with the dynein complex. In correspondence, the Golgi apparatus, which was found to be well-organized around the MTOC in the clones expressing p50-dynamitin-GFP, was not reorientated toward the IS, nor was the MTOC (Fig. S3, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200801014/DC1>).

Dynein siRNA interference prevents MTOC translocation

To further assess the role of the dynein–dynactin complex in T cell activation, we impaired its nucleation by knocking down the expression of the DHC subunit (530 kD). The DHC is composed of the globular ATPase domains that interact with microtubules and allows the movement of dynein along them (Hirokawa, 1998; Vaughan, 2005). In these experiments, J77 Jurkat and

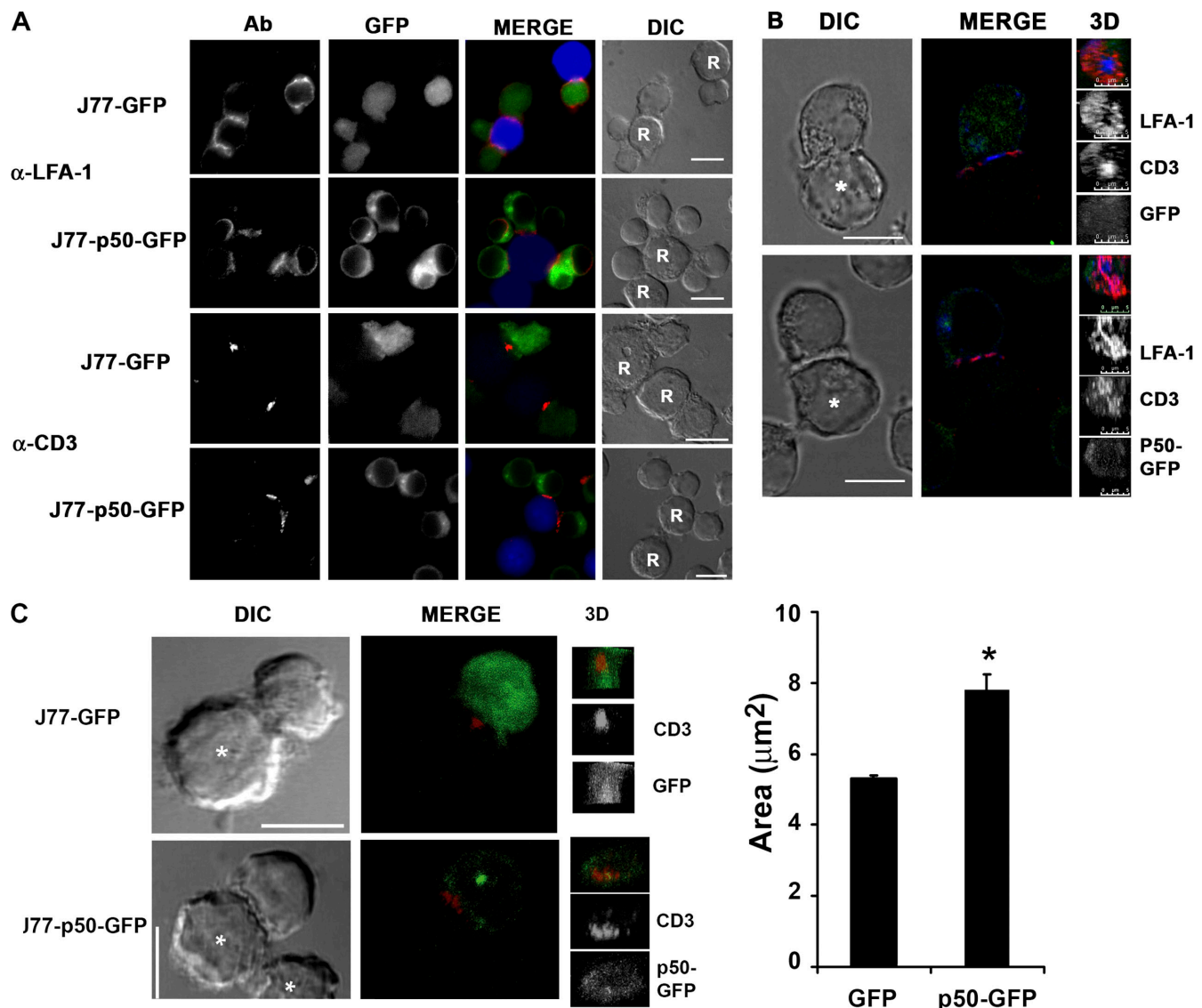


Figure 3. Dynamitin-disrupted T cells form altered LFA-1 and CD3 clusters at the contact area with the APC. (A) LFA-1 and CD3 cluster at the IS in dynamitin-disrupted cells. Conjugates between J77 Jurkat control (GFP) or dynamitin-disrupted cells were formed, fixed as in Fig. 1, and stained for LFA-1 or CD3, followed by rhodamine red X-labeled anti-mouse secondary antibody (red in merged images). GFP, green; R, Raji APC (CMAC-labeled, blue). (B) LFA-1 and CD3 show a correct SMAC architecture in control cells (GFP) but not in dynamitin-disrupted cells. A confocal z slice of conjugates formed and processed as in A is shown (3D). LFA-1 is shown in red (Alexa 568-labeled anti-mouse secondary antibody) and CD3 was detected with 448 antibody, followed by an Alexa 647-labeled anti-rabbit secondary antibody (blue). GFP, green. (C) In dynamitin-disrupted clones, CD3 clusters occupy a larger area and appear scattered at the contact area with the APC. A confocal z section of conjugates formed and processed as in A is shown (3D). CD3 was detected with T3b monoclonal antibody followed by rhodamine red X-labeled anti-mouse secondary antibody (red). Asterisks indicate SEE-Raji APC (B and C). (C, right) Quantitative analysis of the CD3-stained area at the IS. Data are means \pm SEM. 20 cells were analyzed per condition. *, $P < 0.05$ versus GFP (Student's t test). Bars, 10 μm .

CH7C17 T cells were transfected with a combination of two specific DHC siRNA oligonucleotides (siDHC). In both cell types, DHC expression was reduced by 70% with respect to cells expressing control oligonucleotide (siNeg; Fig. 2, A and B). In siNeg-transfected cells, DHC accumulated at the IS around the translocated MTOC (Fig. 2, A and B), as seen for other dynein components (Fig. 1). However, in DHC-interfered cells, although some of the remaining DHC gathered at the IS, this distribution was markedly altered (Fig. 2, A and B). Only 35% of the MTOC were translocated to the IS in DHC-interfered J77 cells stimulated with SEE, representing an inhibition with respect to control cells of $>50\%$ (Fig. 2 A). In the case of DHC-interfered CH7C17 cells,

the proportions of cells with MTOC translocated toward SEB or HA peptide-loaded APC were, respectively, 23.4 and 23.6% compared with corresponding control values of 85.8 and 84.4% (Fig. 2 B). These data agree with the observed inhibition of MTOC translocation in the J77 clones expressing p50-dynamitin-GFP, and point to a direct role of dynein–dynactin complex activity in MTOC translocation.

p50-dynamitin-GFP overexpression alters SMAC architecture at the IS

We next examined the effect of p50-dynamitin-GFP expression on the organization of the SMAC at the IS, after TCR activation.

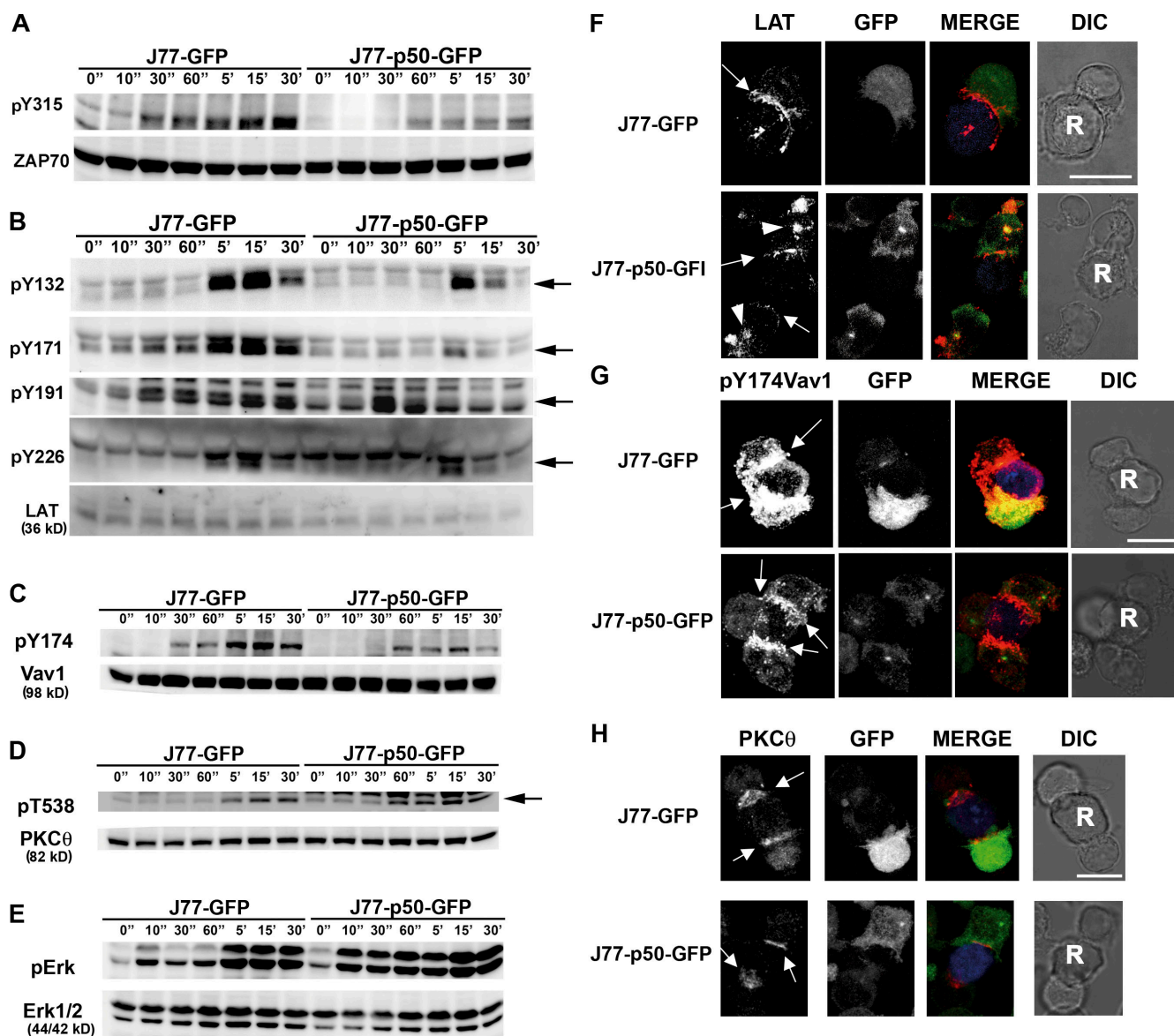


Figure 4. Overexpression of p50-dynamin-GFP impairs sustained signaling via the TCR. (A–E) Western analysis of signaling proteins in J77-GFP or dynamitin-disrupted cells upon stimulation with SEE for the times indicated. Whole lysates were processed for phosphorylated and total protein expression as follows: (A) ZAP70 pY315 and total ZAP70; (B) LAT pY132, pY171, pY191, pY226, and total LAT; (C) Vav1 pY174 and total Vav1; (D) PKCθ pT538 and total PKCθ; and (E) phosphorylated and total Erk1/2, followed by the corresponding HRP-conjugated secondary antibodies. One out of four representative experiments is shown. Arrows indicate target band sizes. (F–H) Conjugates formed and stained for proteins involved in IS formation and maturation (red in merged images, Alexa 568-labeled anti-mouse secondary antibody): LAT (F; arrowheads indicate the fraction of LAT associated with the nontranslocated MTOC in the dynamitin-disrupted clones and not delivered to the nascent IS), pY174Vav1 (G), and PKCθ (H). Arrows indicate the IS area. R, SEE-Raji APC (CMAC-labeled, blue). Bars, 10 μm.

For this purpose, both LFA-1 and CD3 localization were analyzed to assess p- and cSMAC architecture, respectively. LFA-1 integrin clustering was comparable between control J77 T cells and clones expressing p50-dynamin-GFP (Fig. 3 A), and CD3 molecules were consistently redistributed toward the contact area with the SEE-pulsed Raji APC (Fig. 3 A). Analysis of SMACs showed that LFA-1 integrin was not clearly displaced from the cSMAC in the dynamitin-disrupted clones; this contrasted with control Jurkat cells, in which the characteristic LFA-1 integrin-pSMAC ring was evident (Fig. 3 B). However, the p50-dynamin-GFP colocalized with ADAP, forming a ring at the IS (Fig. S4, available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200801014/DC1>). This supports

the idea that dynein and dynactin are closely associated at the IS and that MTOC movement is functionally linked to ADAP (Combs et al., 2006). Interestingly, confocal 3D reconstruction revealed that CD3 in dynamitin-disrupted T cells was localized in several microclusters near the pSMAC rather than in a central cluster (Fig. 3 C). Quantitative analysis confirmed that this anomalous distribution was associated with an increased CD3 cluster area in dynamitin-disrupted clones (Fig. 3 C, right). The altered CD3 distribution could provoke or instead be a reflection of an alteration in the distribution of activated downstream effectors in the IS. Confirming this, although staining with the anti-phosphotyrosine antibody (4G10) revealed an accumulation

of phosphotyrosine at the IS in transfected control T cells, the clustering of tyrosine phosphorylated proteins in dynamitin-disrupted clones was not as clear cut (Fig. S5).

Inhibition of the dynein–dynactin complex alters sustained signaling downstream of the TCR

The results presented earlier prompted us to study how different signaling pathways are affected by disruption of the dynein–dynactin complex. We next examined the specific phosphorylation of ZAP70, LAT, Vav1, PKC θ , and Erk1/2, molecules known to be important for T cell activation. Phosphorylation of ZAP70 at Y315 was lower in the dynamitin-disrupted clones compared with control cells (Fig. 4 A). This residue functions as a docking site for the SH2 domain of Vav1 and is a marker of T cell activation (Wu et al., 1997). ZAP70 phosphorylates LAT at residue Y191 (Paz et al., 2001), this event being necessary for the scaffolding function of LAT. Phosphorylation of LAT at Y191 in dynamitin-disrupted T cells was observed 10–30 s after SEE stimulation but, in contrast to control cells, was not sustained for longer periods (Fig. 4 B). Consistently, Vav1, which associates with LAT through phospho-Y191 (Paz et al., 2001), showed reduced phosphorylation on Y174 in dynamitin-disrupted T cells (Fig. 4 C), which suggests that the guanine nucleotide exchange activity of Vav1 may be affected in these cells (Lopez-Lago et al., 2000).

Defective tyrosine phosphorylation of other LAT residues (Y132, Y171, and Y226) was also detected in dynamitin-disrupted clones. Once phosphorylated, these tyrosines act as docking sites for specific signaling proteins (Paz et al., 2001), and each shows characteristic activation kinetics (Houtman et al., 2005). Immediate early phosphorylation was consistently detected in the clones; i.e., see Y191-LAT (Fig. 4 B). However, the signal vanished more rapidly in dynamitin-disrupted cells (see phosphorylation of Y191, Y171, Y226, and Y132 after 5 min and beyond; Fig. 4 B). These data suggest that sustained tyrosine phosphorylation induced upon TCR triggering is impaired when MTOC translocation is altered, thereby disrupting the regulation of ZAP70 and LAT phosphorylation upon TCR stimulation. This would affect signaling pathways downstream of LAT, as observed for Vav1 activation (Fig. 4 C). In contrast, phosphorylation of PKC θ at T538 occurred more rapidly in dynamitin-disrupted clones than in control cells (Fig. 4 D), and Erk1/2 phosphorylation was faster and stronger (Fig. 4 E).

LAT from intracellular compartments is not delivered to the IS in cells overexpressing p50-dynamitin-GFP

Several signaling proteins, including LAT, accumulate at the IS of untransfected T cells upon TCR triggering (Blanchard et al., 2002; Bonello et al., 2004). Immunofluorescence analysis showed that LAT was also concentrated at the IS of control cells transfected with GFP (Fig. 4 F, arrows). In contrast, in the dynamitin-disrupted clones, the fraction of LAT associated with intracellular compartments (Bonello et al., 2004) remained in the vicinity of the MTOC (Fig. 4 F, arrowheads). Therefore, this LAT fraction cannot contribute to the formation and maturation of the IS because the MTOC remains delocalized from it. Vav1 phosphorylated

at Tyr174 did accumulate at the IS (Fig. 4 G, arrows), though to a lesser extent than in control cells, which is consistent with the low level of phosphorylation detected in the dynamitin-disrupted clones (Fig. 4 C). In contrast, PKC θ clustered at the IS in the dynamitin-disrupted clones (Fig. 4 H).

DHC silencing impairs TCR signaling

Reductions in the phosphorylation of ZAP70 (Y315), LAT (Y132), LAT (Y191), Vav1 (Y174), and downstream targets were also observed in DHC-interfered Jurkat cells (Fig. 5 A). As with the p50-dynamitin-GFP clones, phosphorylation of LAT (Y132) in DHC-interfered cells was strongly reduced. Moreover, PLC γ -1 phosphorylation at residue Y783 was also diminished. LAT phosphorylation at residues Y132, Y171, Y191, and Y226 was also strongly reduced (Fig. 5 A). Similar results were obtained in DHC-interfered CH7C17 cells stimulated either with specific HA antigenic peptide (Fig. 5 B) or with SEB (not depicted). These results establish a correlation between the failure in MTOC translocation detected in DHC-interfered cells and the decrease in LAT phosphorylation. In contrast, phosphorylation of PKC θ (T538) and Erk1/2 were not impaired, but rather occurred slightly more rapidly or were accentuated in DHC-interfered cells compared with control cells (Fig. 5 A and B), which is parallel to what occurred in dynamitin-disrupted cells (Fig. 4, D and E).

Interleukin-2 (IL-2) production is impaired in T cells by p50-dynamitin-GFP overexpression or knockdown of dynein expression

The functional effect of impaired MTOC translocation was assessed by examining T cell activation parameters. In p50-dynamitin-GFP-overexpressing cells forming conjugates with SEE-pulsed Raji APC, the expression of CD69 was not altered compared with parental T cells (not depicted) or GFP-overexpressing control clones (Fig. 6 A). But IL-2 production by the dynamitin-disrupted clones was negligible, as measured both in culture supernatants from cell conjugates and in their counterpart intracellular compartments (Fig. 6, B and C). Reduced IL-2 production was also detected in DHC-interfered cells (Fig. 6 D), which correlates with the observed decrease in MTOC translocation.

Discussion

In this study, we investigated the involvement of microtubules' minus-end motor complexes in the movement of the MTOC toward the IS. In this sense, MTOC movement and positioning has been analyzed before in relation to dynein in several functional processes, such as cell polarization and division (Vallee and Stehman, 2005; for review see Hook and Vallee, 2006). Dynein–dynactin complexes might also be important in T cell physiology because MTOC positioning during T cell activation helps proper effector functions such as cytokine secretion (Kupfer et al., 1991) and target cell killing (Kupfer and Dennert, 1984; Kupfer et al., 1985; Stinchcombe et al., 2001). We provide evidence that dynein–dynactin is functionally required

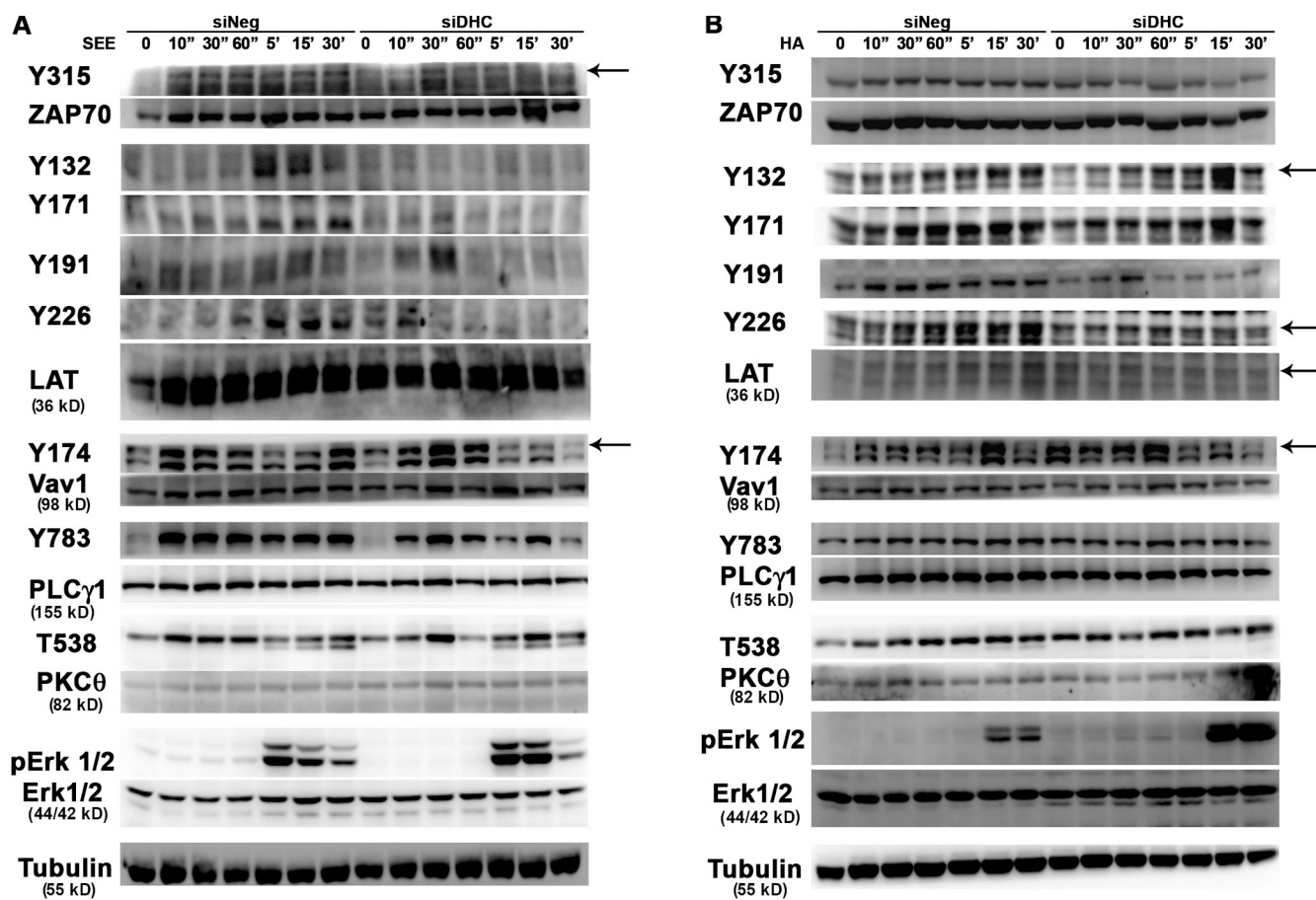


Figure 5. TCR-sustained signaling is impaired by RNA interference of DHC (A and B) Western analysis of signaling proteins in conjugates formed for the times indicated between DHC silenced T cells (siDHC) or controls (siNeg) and activated APC. T cell-APC pairs were J77 cells and SEE-pulsed Raji cells (0.3 μ g/ml; A) and CH7C17 cells and HA peptide-preloaded Hom2 cells (50 μ g/ml; B). pY783 PLC γ 1, PLC γ 1 phosphorylated on Y783; all other kinases are as in Fig. 4 (A-E). One out of four representative experiments is shown. Tubulin is shown as additional loading control. Arrows indicate target band sizes.

to pull microtubules so as to bring the MTOC into close apposition with the plasma membrane at the IS. To this end, we have either disrupted the dynein-dynactin complex by overexpressing p50-dynamitin-GFP or prevented its formation by silencing the expression of DHC.

Cytoplasmic dynein is a protein multicomplex that has been detected in several subcellular scenarios, including being associated with the MTOC or being bound to microtubules during the transport of varied cargoes (Vallee et al., 2004) and, more importantly for this study, at the cell cortex (Busson et al., 1998). Our finding that dynactin is involved in MTOC translocation toward the IS is relevant because the p74 dynein intermediate chain has been shown to cluster at the pSMAC, where it colocalizes with ADAP (Combs et al., 2006). However, whereas this earlier study did not describe the regulation of the dynein complex and its participation in IS formation, our current study provides compelling experimental evidence that the dynactin and dynein complexes cooperate in the relocation of the MTOC to the IS. Our results show that overexpression of p50-dynamitin-GFP prevents interaction between p74 intermediate chain and p150-glued. This in turn prevents remodeling of the complex upon SEE stimulation, resulting in defective MTOC movement and reorientation. Interestingly, overexpression of p50-dynamitin-GFP does not prevent

localization of dynein and dynactin subunits at the IS but instead seems to interfere with their activity toward microtubules. Furthermore, knockdown of DHC expression, which abolished DHC accumulation at the contact site with the APC, also prevented MTOC translocation. This supports a model in which dynein-dynactin complexes dock at the cell periphery and pull on the microtubules to bring the MTOC in apposition to them. Consistently, inhibition of microtubule assembly with nocodazole has been reported to alter MTOC positioning in a manner dependent on dynein activity, and this process was additionally found to involve actomyosin contractility (Burakov et al., 2003). These observations, together with the loss of cortical dynein after cytochalasin D treatment (Busson et al., 1998), point to a role for the actomyosin cytoskeleton in MTOC positioning.

The link between ADAP/Fyb/SLAP130 and dynein intermediate chain may also represent a mechanism for docking the complex to the pSMAC at the IS (Combs et al., 2006). It is worth considering that ADAP is a well-known substrate of Fyn kinase, which is involved in TCR signal transduction (da Silva et al., 1997) and has been shown to be important for the formation of the pSMAC, LFA-1 clustering, and IL-2 production upon specific antigenic stimulation (Wang et al., 2004). We recently detected Fyn kinase activity in association with MTOC translocation toward the IS.

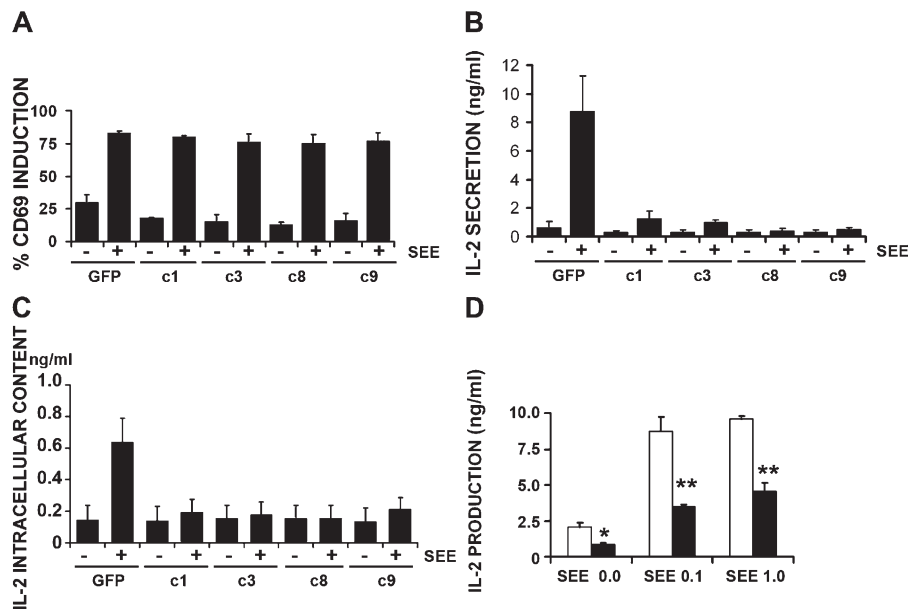


Figure 6. IL-2 production is impaired by p50-dynamin-GFP overexpression and DHC interference. (A) CD69 induction was detected by flow cytometry in J77 Jurkat clones overexpressing GFP or p50-dynamin-GFP (c) and conjugated with unprimed or SEE-pulsed Raji APC for 16 h (percentage of cells is shown). Three experiments were performed in triplicate. (B and C) IL-2 was detected by ELISA in culture supernatants (B) or cell lysates (C) from the cultures in A. Three experiments were performed in triplicate. (D) IL-2 detected by ELISA in cell supernatants from DHC-silenced J77 cells (siDHC, closed bars) and controls (siNeg, open bars) conjugated with SEE-pulsed Raji APC with the indicated doses (μ g/ml). Three experiments were performed in triplicate. Data are means \pm SD. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.001$ (Student's t test).

Moreover, $\text{fyn}^{-/-}$ T cells were unable to translocate their MTOC toward an APC presenting antagonist peptides (Martin-Cofreces et al., 2006). This result correlates with recent evidence showing that $\text{fyn}^{-/-}$ natural killer cells are deficient in the cytolysis of target cells (Bloch-Queyrat et al., 2005), which might be a direct consequence of deficient MTOC translocation toward the IS. Fyn has been functionally linked to the tubulin cytoskeleton in neurons, where it phosphorylates Tau (Lee et al., 2004) and regulates its interaction with γ -tubulin complexes, which are involved in microtubule formation (Sulimenko et al., 2006). It is possible, therefore, that dynein–dynactin complexes act at the earliest steps of T-APC contact, where, together with ADAP and Fyn, they provide a mechanism for reorganizing the T cell tubulin cytoskeleton.

The dynamic association/dissociation of the dynein and dynactin complex upon SEE stimulation, which correlates with the observed changes in tubulin acetylation during this process (Serrador et al., 2004), may be a consequence of microtubule dynamics, supporting the role of this complex in the microtubule organization in T cells. Consistent with this idea, dynein–dynactin complexes in Jurkat cells interact with EB1 (Berrueta et al., 1999), a member of a protein family that plays a role in docking the microtubule cytoskeleton at the cell cortex, through its binding to the plus-end tips of the microtubules (Lee et al., 2000). Moreover, because the dynein–dynactin complex localizes at the pSMAC, where the microtubules are docked at the IS, it is conceivable that the molecular motor complex is pulling on the microtubules in a coordinate manner. The resulting movement would be a vectorial displacement directed to the center of the pSMAC ring, where the MTOC becomes localized as the pSMAC is structured.

We have observed that the Golgi apparatus does not translocate to the nascent IS when dynein–dynactin is inhibited and is thus dependent on microtubule minus-end motor activity. Microtubule plus-end motors (i.e., kinesins) have been shown to be dispensable for CTL killing. Inhibition of the kinesin-driven movement of lytic granules promotes their accumulation

at the MTOC (the minus-end tip of the microtubules), but there are no defects in the cell killing process and MTOC translocation (Stinchcombe et al., 2006). Hence, target cell killing is absolutely dependent on MTOC/Golgi apparatus translocation to the IS, which confirms previous studies (Kupfer et al., 1985). In another study, B cell proliferation was detected only in those antigen-presenting B cells that were in close contact with the secretory area of helper T cells (Kupfer et al., 1994), which strongly supports the importance of MTOC translocation for the effector function of diverse immune cells.

Our data show that the failure of MTOC and Golgi re-orientation toward the IS has important consequences for sustained TCR signaling, which is necessary for full T cell activation. This helps to explain the lack of cytokine secretion by T cells when the MTOC fails to translocate (this paper; Serrador et al., 2004). Our data thus underscore the importance of correct MTOC translocation not only for polarized secretion but also for cytokine production. This is an important finding that suggests the existence of two key regulatory checkpoints during antigenic T cell activation: (1) antigen recognition and immediate signals triggered by TCR engagement, and (2) TCR-driven MTOC translocation, which represents a positive feedback for sustained TCR signaling. Accordingly, we also observed deficiencies in Vav1 phosphorylation at Y174 in dynamin-disrupted cells. Phosphorylation of Vav1 (Y174) is a marker of the activation of Vav1 (Lopez-Lago et al., 2000). In this regard, a correlation has been found between Fyn activation and the phosphorylation of Vav1 upon antagonist-mediated TCR activation (Huang et al., 2000), and subsequent MTOC translocation in Fyn-deficient T cells (Martin-Cofreces et al., 2006). Supporting this, the MTOC is not correctly translocated in $\text{vav1}^{-/-}$ double-positive thymocytes (Ardouin et al., 2003). Thus, the activity of Vav1 as a GEF for members of the Rho family of GTPases may be important for MTOC translocation, and might be facilitated by the reorganization of different molecular complexes at the T cell-APC contact area. Moreover, Vav1 has been shown to control both TCR-CD3

and LFA-1 clustering at the IS (Krawczyk et al., 2002). These results point to a role for dynein–dynactin complexes not only in MTOC translocation but also in the regulation of the activity of molecules important for the control of MTOC translocation throughout early TCR signaling. Together, these lines of evidence might indicate a role for the dynein–dynactin complex as a molecular platform that nucleates proteins and supplies signaling molecules to the IS. In this model, the dynein–dynactin complex would be upstream of Vav1 activation in the pathways emerging from the TCR.

The idea that dynein–dynactin complexes could act as docking sites for the relocation and delivery of regulatory and signaling proteins in T cells is attractive because these multimolecular complexes of at least 1.5 MD offer multiple domains for protein interactions (Vallee and Stehman, 2005). The dynein–dynactin complex may thus be important for the correct spatial distribution of key proteins at the IS, and our results with LFA-1 and CD3 provide evidence to support this proposal; when dynein–dynactin complexes are dissociated by dynamitin overexpression, LFA-1 does not form a clear ring at the periphery of the IS, and CD3 is distributed in multiple clusters near the peripheral ring instead of being localized at a central cluster. The altered localization of CD3 could contribute to the anomalous signaling observed in dynamitin-disrupted T cell clones or DHC-silenced cells after antigenic stimulation.

An alternative explanation might be that failed MTOC translocation could prevent the IS from adopting a proper conformation as a result of deficient activation and targeting to the IS of a second pool of signaling proteins, such as Lck, Fyn (Ley et al., 1994), or LAT (Bonello et al., 2004). It is interesting that when a nonphosphorylatable LAT mutant (Y132,191,171,226F) is expressed in LAT-deficient Jurkat cells, the intracellular LAT pool does not polarize, which demonstrates that specific phosphorylation of LAT is critical for its recruitment to the IS (Bonello et al., 2004). However, our data do not show a complete failure of LAT phosphorylation upon TCR triggering but rather a reduction in its extent. This defect could be attributed to impairment of the supply of a second wave of LAT molecules from intracellular vesicle stores to the IS. Hence, it is conceivable that there may be two waves of activation upon TCR triggering, and that failed MTOC translocation (which is normally accomplished within 2–5 min) might specifically affect the second wave. In addition, some signaling events seem to be slightly accelerated by dynein–dynactin inhibition, such as PKC θ and Erk1/2 phosphorylation. This defect may be related to the lack of correct TCR activation, which would highlight signaling through integrins. PKC θ activation would therefore be regulated by the balance between LFA-1 and the strength of TCR activation.

Our study provides mechanistic insights into the relationship between MTOC translocation and T cell activation, as measured by the activation of T cell signaling molecules and IL-2 production. There is growing evidence for the importance of MTOC translocation in this process (for reviews see Sancho et al., 2002b; Billadeau et al., 2007), e.g., in relation to LAT (Bonello et al., 2004), Fyn kinase (Martin-Cofreces et al., 2006), HDAC6 activity (Serrador et al., 2004), and, in the present study, the dynein–dynactin complex. In sum, our data support a role for

the dynein–dynactin complex in regulating the signaling events that follow TCR activation, possibly by acting as a multimolecular scaffold structure that anchors at the pSMAC and plays a direct role in MTOC reorientation and recruitment to the IS.

Materials and methods

Cells and mutant constructs

Jurkat J77c20 (J77) V β 8 T cell clones (Niedergang et al., 1997) and the lymphoblastoid B cell lines Raji and Hom2 were cultured in complete medium (RPMI-1640 and 10% FCS; Invitrogen). CH7C17 cells (bearing a V β 3 TCR specific for HA peptide and SEB; Hewitt et al., 1992) were cultured in complete medium supplemented with 4 μ g/ml puromycin and 0.4 mg/ml hygromycin B. Culture medium for clones stably expressing GFP or p50-dynamitin-GFP was supplemented with 1 mg/ml G418. The cDNA coding for p50-dynamitin-GFP (Echeverri et al., 1996) was provided by R. Vallee (Columbia University, New York, NY).

Reagents and antibodies

The 80-kD fibronectin fragment (FN80) was a gift of A. García-Pardo (Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid, Spain). Poly-L-lysine (PLL) and G418 were obtained from Sigma-Aldrich, and SEE was obtained from Toxin Technology. Puromycin was obtained from InvivoGen, hygromycin B was obtained from Roche, the fluorescent secondary antibodies (Alexa 568 and 647, and rhodamine red X) and cell trackers (7-amino-4-chloromethylcoumarin [CMAC], 5-(and-6)-([4-chloromethyl]benzoyl)amino)tetramethylrhodamine [CMTMR]) were from obtained from Invitrogen, and rabbit muscle enolase was obtained from Sigma-Aldrich. All other reagents were of the purest grade available. The antibodies T3b, 448 (both anti-human-CD3), 4G10, and TP1/55 (anti-human CD69) were produced in the laboratory. Anti-phosphoVav (Y174) was a gift of X. Bustelo (Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca, Spain). JL8 anti-GFP, biotin-labeled anti-human V β , anti-p150-glued, anti-p50-dynamitin, and anti-Fyb/ADAP/SLAP130 monoclonal antibodies were obtained from BD Biosciences/Clontech. Unconjugated and FITC-conjugated anti- α -tubulin, anti- γ -tubulin, and anti-DHC (clone 440) were obtained from Sigma-Aldrich. Anti-Lck, anti-PKC θ (Sc-13 and Sc-18), and polyclonal goat anti-DHC were obtained from Santa Cruz Biotechnology, Inc. Anti-Vav, anti-LAT, anti-phospho-LAT (Y191 and Y226), and anti-Erk1/2, as well as anti-p74 dynein intermediate chain clone 74.1 were obtained from Millipore. Anti-phospho-LAT (Y132), anti-ZAP70, and anti-phospho-ZAP70 (Y493, Y315) were obtained from Abcam. Anti-phospho-LAT (Y171), anti-phospho-Erk1/2, anti-phospho-PLC γ -1 (Y783), anti-PLC γ -1, and anti-phospho-PKC θ (T538) were obtained from Cell Signaling Technology.

siRNA assay

Double-stranded DNC siRNA (21 bp; DYNC1H1, available from GenBank/EMBL/DBJ under accession no. NM_001376) and the negative control were obtained from Ambion. Once we identified two oligonucleotides that knocked down the expression of the protein, a 1:1 mix of the two was used: 5'-GCACCGACAUGAUCUUAATT-3' and 5'-CCAGGAGUUUCGACAGUGATT-3'. 2×10^7 Jurkat J77c20 cells were electroporated with the siRNA using the Gene Pulser II electroporation system (Bio-Rad Laboratories). Cells were cultured for 3 d and a new round of transfection was performed. Cells were used and analyzed at day six. Efficiency was assessed by Western blotting and immunofluorescence.

Cell conjugate formation, MTOC translocation, and functional assays

Raji B cells were loaded with the blue fluorescent cell tracker CMAC as described previously (Sancho et al., 2002a). Cells were then incubated for 20 min with 0.3 μ g/ml SEE (or vehicle control) and washed extensively. Hom2 cells were loaded with CMAC and incubated for 2 h with 50 μ g/ml HA peptide or 10 μ g/ml SEB. T cells (Jurkat or CH7C17 cells, 2×10^5 cells per slide) were mixed with an equal number of APC; the cell mixes were then centrifuged at a low speed to favor conjugate formation, gently resuspended, and plated onto slides coated with PLL (Jurkat) or fibronectin (FN; CH7C17) in humidified incubation chambers, and finally allowed to settle for 15 min at 37°C. For general analyses, PLL- or FN-adhered cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PBS and permeabilized for 5 min in 2% paraformaldehyde and 0.2% Triton X-100 in TBS-BSA (3%). For analysis of dynein and dynactin components, cells were fixed in 4% paraformaldehyde in PHEM (60 mM Pipes, 25 mM Hepes, 5 mM EGTA, and 2 mM MgCl $_2$, pH 6.9) and permeabilized in 2% paraformaldehyde and 0.2% Triton X-100 in PHEM-BSA (3%). Cell conjugates were stained with the indicated antibodies in immunofluorescence solution (50 mM Tris-HCl, pH 7.2,

150 mM NaCl, 3% BSA or PHEM, 3% BSA, and 0.2% Triton X-100 as required). Alexa 647-, Alexa 568-, and rhodamine red X-labeled highly cross-absorbed secondary antibodies were used as was appropriate (Invitrogen). Fixed cells were mounted on a mowiol-based mounting medium (Prolong Gold antifade reagent; Invitrogen) and observed at 22°C on a photomicroscope (DMR; Leica) with an HCX PL APO 63/1.32-0.6 oil objective (Leica) coupled to a COHU 4912–5010 charge-coupled device camera (Cohu; Figs. 2 and 3 A). The acquisition software was QFISH V2.1 (Leica), and images were processed with Photoshop CS (Adobe). Alternatively, cells were viewed with a TCS SP confocal laser scanning unit (Leica) attached to an inverted epifluorescence microscope (DMIRBE; Leica) with an HCX PL APO 63x/1.32-0.6 oil objective lens (Figs. 3 C and S3) or with a confocal laser scanning unit (TCS SP5; Leica) attached to an inverted epifluorescence microscope (DMI6000; Leica) with an HCX PL APO 63X/1.40-0.6 oil λ_{BL} objective. Images were acquired and processed with accompanying confocal software (LCS; Leica). 3D maximal projections of the T cell–APC contact area were produced with LCS to obtain a z stack projection. Figures were composed with Photoshop CS.

The proportion of conjugates with MTOC redistributed close to the T cell–APC contact area was calculated by random selection of >150 conjugates from at least three independent experiments. Results are expressed as the percentage of conjugates with MTOC redistributed to the contact area. CD3 distribution was used as an index of cSMAC localization without the need to permeabilize cells. Cells were analyzed by confocal microscopy, with the same conditions used for control and dynamitin-disrupted cells. 3D maximal projections were generated to produce a z stack projection of the region of cell–cell contact. The stained area was then calculated using confocal software (Leica).

For IL-2 production and CD69 expression assays, conjugates were formed as indicated above in flat-bottom 96-well plates. Supernatants were harvested after 16 h of coculture and analyzed for IL-2 production by ELISA (Diaclone). T cells from the same coculture were lysed and analyzed for intracellular IL-2 content (ELISA) or for CD69 expression using conventional double immunofluorescence techniques and flow cytometry in a FACScalibur (Becton Dickinson). Data were processed with CellQuest Pro 4.0.2 software (BD Biosciences).

Time-lapse fluorescence confocal microscopy

Raji APC (5×10^5 ; SEE-pulsed or controls) were allowed to adhere on FN-coated coverslips. The cells were maintained in 1 ml of HBSS (2% BSA) in Attofluor open chambers (Invitrogen) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, and placed on the microscope stage. Jurkat T cells (5×10^5) were added and a series of fluorescence and differential interference contrast frames were captured simultaneously every 30 s using a TCS SP confocal laser scanning unit attached to a DMIRBE inverted epifluorescence microscope with a HCX PL APO 63x/1.32-0.60 oil objective (M1 and M3), or a TCS SP5 confocal laser scanning unit attached to an inverted epifluorescence microscope (DMI6000), with an HCX PL APO 63X/1.40-0.6 oil λ_{BL} (M2). Images were acquired and processed with the accompanying confocal software (LCS; Leica). Premiere 6.0 software (Adobe) was used for generating QuickTime videos (Apple).

Immunoprecipitation and Western blotting

For immunoprecipitation, Jurkat cells were serum starved and Raji B cells were cultured in medium containing 2% FCS for 18 h. Raji cells (5×10^6) were then preloaded with 0.3 μ g/ml SEE at 37°C for 20 min and mixed with 10^8 Jurkat cells at 37°C. After incubation, cells were lysed at 4°C for 40 min in 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 1% NP-40, 0.2% Triton X-100, 150 mM NaCl, and phosphatase and protease inhibitors. Cell lysates were spun at 2,500 g for 10 min to remove cell debris and nuclei. Supernatants were precleared with protein G–sepharose beads at 4°C overnight and immunoprecipitated with mouse anti-p74 or anti-p150-glued for 4 h at 4°C. Protein G–sepharose beads were added for 20 min at 4°C. Immunoprecipitates were washed six times with lysis buffer and processed for Western blotting.

For Western blots and analysis of phosphorylation during T cell presentation, immunoprecipitated proteins and whole lysates (lysed as above) were analyzed by SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membranes, and probed with the indicated antibodies in TBS–Tween 20. Bound antibodies were reacted with HRP secondary antibodies, and proteins were visualized by enhanced chemiluminescence with SuperSignal West Pico chemiluminescent substrate (Pierce). Densitometric analyses were performed with ImageGauge 3.46 software (Fujifilm).

Online supplemental material

Fig. S1 shows that dynein–dynactin components localize at MTOC, microtubules, and cortical tubulin cytoskeleton in Jurkat T cells. Fig. S2 illustrates the generation of p50-dynamitin-GFP clones, showing a FACS profile of

GFP expression in p50-dynamitin-GFP J77c120 T cell clone c1 and a Western blot of GFP in J77c120 T cell clones. Fig. S3 shows a z projection of confocal slices where Golgi translocation toward the IS is impaired in dynamitin-disrupted cells (clone c8) conjugated with SEE-pulsed Raji cells. Fig. S4 shows a confocal z slice showing that ADAP colocalizes with p50-GFP at the IS formed by the dynamitin-disrupted cells. Fig. S5 shows a confocal z projection of conjugates formed as in Fig. 1 and stained for phosphotyrosine, showing that 4G10 staining (red in merge images, labeled with Alexa 568) was not clustered at the contact area in p50-dynamitin-GFP clones as it was in GFP clones. Videos 1–3 show time-lapse confocal video microscopy showing the dynamics of MTOC movement in Jurkat T cells overexpressing paxillin-GFP (green, M1) or p50-dynamitin-GFP (green, M2 and M3) conjugated with SEE-pulsed Raji APC loaded with CMCTR cell tracker (red/orange). Supplemental videos are displayed as image sequences in Fig. 1 F at the times indicated. Online supplemental material is available at <http://www.jcb.org/cgi/content/full/jcb.200801014/DC1>.

We thank Dr. S. Bartlett, M. Gómez, and J. Serrador for helpful discussion and editing. We also thank Dr. R. Vallee for valuable reagents and support and Dr. M. Poenie for helpful discussion.

This study was supported by the Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Sanidad y Consumo, Spain (Red Temática de Investigación en Enfermedades Cardiovasculares grant RD06/0021/2006 and postdoctoral fellowship to N.B. Martín-Cófreces), Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (grant BFU200508435/BMC and Formación Profesorado Universitario fellowship to J. Robles-Valero), Juan March Foundation (Ayuda a la Investigación Básica 2002) and grant INSINET0159/2006 from Comunidad de Madrid.

Submitted: 3 January 2008

Accepted: 14 August 2008

References

- Ardouin, L., M. Bracke, A. Mathiot, S.N. Pagakis, T. Norton, N. Hogg, and V.L. Tybulewicz. 2003. Vav1 transduces TCR signals required for LFA-1 function and cell polarization at the immunological synapse. *Eur. J. Immunol.* 33:790–797.
- Barreiro, O., H. de la Fuente, M. Mittelbrunn, and F. Sanchez-Madrid. 2007. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol. Rev.* 218:147–164.
- Berrueta, L., J.S. Tirnauer, S.C. Schuyler, D. Pellman, and B.E. Bierer. 1999. The APC-associated protein EB1 associates with components of the dynactin complex and cytoplasmic dynein intermediate chain. *Curr. Biol.* 9:425–428.
- Billadeau, D.D., J.C. Nolz, and T.S. Gomez. 2007. Regulation of T-cell activation by the cytoskeleton. *Nat. Rev. Immunol.* 7:131–143.
- Blanchard, N., V. Di Bartolo, and C. Hivroz. 2002. In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity.* 17:389–399.
- Bloch-Queyrat, C., M.C. Fondaneche, R. Chen, L. Yin, F. Relouzat, A. Veillette, A. Fischer, and S. Latour. 2005. Regulation of natural cytotoxicity by the adaptor SAP and the Src-related kinase Fyn. *J. Exp. Med.* 202:181–192.
- Bonello, G., N. Blanchard, M.C. Montoya, E. Aguado, C. Langlet, H.T. He, S. Nunez-Cruz, M. Malissen, F. Sanchez-Madrid, D. Olive, et al. 2004. Dynamic recruitment of the adaptor protein LAT: LAT exists in two distinct intracellular pools and controls its own recruitment. *J. Cell Sci.* 117:1009–1016.
- Burakov, A., E. Nadezhkina, B. Slepchenko, and V. Rodionov. 2003. Centrosome positioning in interphase cells. *J. Cell Biol.* 162:963–969.
- Busson, S., D. Dujardin, A. Moreau, J. Dompierre, and J.R. De Mey. 1998. Dynein and dynactin are localized to astral microtubules and at cortical sites in mitotic epithelial cells. *Curr. Biol.* 8:541–544.
- Combs, J., S.J. Kim, S. Tan, L.A. Ligon, E.L. Holzbaur, J. Kuhn, and M. Poenie. 2006. Recruitment of dynein to the Jurkat immunological synapse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103:14883–14888.
- Das, V., B. Nal, A. Roumier, V. Meas-Yedid, C. Zimmer, J.C. Olivo-Marín, P. Roux, P. Ferrier, A. Dautry-Varsat, and A. Alcove. 2002. Membrane-cytoskeleton interactions during the formation of the immunological synapse and subsequent T-cell activation. *Immunol. Rev.* 189:123–135.
- da Silva, A.J., Z. Li, C. de Vera, E. Canto, P. Findell, and C.E. Rudd. 1997. Cloning of a novel T-cell protein FYB that binds FYN and SH2-domain-containing leukocyte protein 76 and modulates interleukin 2 production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94:7493–7498.
- Dustin, M.L., M.W. Olszowy, A.D. Holdorf, J. Li, S. Bromley, N. Desai, P. Widder, F. Rosenberger, P.A. van der Merwe, P.M. Allen, and A.S. Shaw. 1998. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell.* 94:667–677.

- Echeverri, C.J., B.M. Paschal, K.T. Vaughan, and R.B. Vallee. 1996. Molecular characterization of the 50-kD subunit of dynactin reveals function for the complex in chromosome alignment and spindle organization during mitosis. *J. Cell Biol.* 132:617–633.
- Grakoui, A., S.K. Bromley, C. Sumen, M.M. Davis, A.S. Shaw, P.M. Allen, and M.L. Dustin. 1999. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 285:221–227.
- Grieshaber, S.S., N.A. Grieshaber, and T. Hackstadt. 2003. *Chlamydia trachomatis* uses host cell dynein to traffic to the microtubule-organizing center in a p50 dynactin-independent process. *J. Cell Sci.* 116:3793–3802.
- Herreros, L., J.L. Rodriguez-Fernandez, M.C. Brown, J.L. Alonso-Lebrero, C. Cabanas, F. Sanchez-Madrid, N. Longo, C.E. Turner, and P. Sanchez-Mateos. 2000. Paxillin localizes to the lymphocyte microtubule organizing center and associates with the microtubule cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 275:26436–26440.
- Hewitt, C.R., J.R. Lamb, J. Hayball, M. Hill, M.J. Owen, and R.E. O'Heir. 1992. Major histocompatibility complex independent clonal T cell anergy by direct interaction of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B with the T cell antigen receptor. *J. Exp. Med.* 175:1493–1499.
- Hirokawa, N. 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport. *Science*. 279:519–526.
- Hook, P., and R.B. Vallee. 2006. The dynein family at a glance. *J. Cell Sci.* 119:4369–4371.
- Houtman, J.C., R.A. Houghtling, M. Barda-Saad, Y. Toda, and L.E. Samelson. 2005. Early phosphorylation kinetics of proteins involved in proximal TCR-mediated signaling pathways. *J. Immunol.* 175:2449–2458.
- Huang, J., D. Tilly, A. Altman, K. Sugie, and H.M. Grey. 2000. T-cell receptor antagonists induce Vav phosphorylation by selective activation of Fyn kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 97:10923–10929.
- King, S.J., C.L. Brown, K.C. Maier, N.J. Quintyne, and T.A. Schroer. 2003. Analysis of the dynein-dynactin interaction in vitro and in vivo. *Mol. Biol. Cell*. 14:5089–5097.
- Krawczyk, C., A. Oliveira-dos-Santos, T. Sasaki, E. Griffiths, P.S. Ohashi, S. Snapper, F. Alt, and J.M. Penninger. 2002. Vav1 controls integrin clustering and MHC/peptide-specific cell adhesion to antigen-presenting cells. *Immunity*. 16:331–343.
- Kupfer, A., and G. Dennert. 1984. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J. Immunol.* 133:2762–2766.
- Kupfer, A., and S.J. Singer. 1989. The specific interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. IV. Membrane and cytoskeletal reorganizations in the bound T cell as a function of antigen dose. *J. Exp. Med.* 170:1697–1713.
- Kupfer, A., G. Dennert, and S.J. Singer. 1985. The reorientation of the Golgi apparatus and the microtubule-organizing center in the cytotoxic effector cell is a prerequisite in the lysis of bound target cells. *J. Mol. Cell. Immunol.* 2:37–49.
- Kupfer, A., S.L. Swain, and S.J. Singer. 1987. The specific direct interaction of helper T cells and antigen-presenting B cells. II. Reorientation of the microtubule organizing center and reorganization of the membrane-associated cytoskeleton inside the bound helper T cells. *J. Exp. Med.* 165:1565–1580.
- Kupfer, A., T.R. Mosmann, and H. Kupfer. 1991. Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88:775–779.
- Kupfer, H., C.R. Monks, and A. Kupfer. 1994. Small splenic B cells that bind to antigen-specific T helper (Th) cells and face the site of cytokine production in the Th cells selectively proliferate: immunofluorescence microscopic studies of Th-B antigen-presenting cell interactions. *J. Exp. Med.* 179:1507–1515.
- Lee, K.H., A.R. Dinner, C. Tu, G. Campi, S. Raychaudhuri, R. Varma, T.N. Sims, W.R. Burack, H. Wu, J. Wang, et al. 2003. The immunological synapse balances T cell receptor signaling and degradation. *Science*. 302:1218–1222.
- Lee, G., R. Thangavel, V.M. Sharma, J.M. Litersky, K. Bhaskar, S.M. Fang, L.H. Do, A. Andreadis, G. Van Hoesen, and H. Ksiezak-Reding. 2004. Phosphorylation of tau by fyn: implications for Alzheimer's disease. *J. Neurosci.* 24:2304–2312.
- Lee, L., J.S. Timauer, J. Li, S.C. Schuyler, J.Y. Liu, and D. Pellman. 2000. Positioning of the mitotic spindle by a cortical-microtubule capture mechanism. *Science*. 287:2260–2262.
- Ley, S.C., M. Marsh, C.R. Bebbington, K. Proudfoot, and P. Jordan. 1994. Distinct intracellular localization of Lck and Fyn protein tyrosine kinases in human T lymphocytes. *J. Cell Biol.* 125:639–649.
- Lopez-Lago, M., H. Lee, C. Cruz, N. Movilla, and X.R. Bustelo. 2000. Tyrosine phosphorylation mediates both activation and downmodulation of the biological activity of Vav. *Mol. Cell. Biol.* 20:1678–1691.
- Lowin-Kropf, B., V.S. Shapiro, and A. Weiss. 1998. Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J. Cell Biol.* 140:861–871.
- Martin-Cofreces, N.B., D. Sancho, E. Fernandez, M. Vicente-Manzanares, M. Gordon-Alonso, M.C. Montoya, F. Michel, O. Acuto, B. Alarcon, and F. Sanchez-Madrid. 2006. Role of Fyn in the rearrangement of tubulin cytoskeleton induced through TCR. *J. Immunol.* 176:4201–4207.
- Melkonian, K.A., K.C. Maier, J.E. Godfrey, M. Rodgers, and T.A. Schroer. 2007. Mechanism of dynactin-mediated disruption of dynactin. *J. Biol. Chem.* 282:19355–19364.
- Monks, C.R., B.A. Freiberg, H. Kupfer, N. Sciaky, and A. Kupfer. 1998. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 395:82–86.
- Niedergang, F., A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 1997. Peptide antigen or superantigen-induced down regulation of TCR involves both stimulated and unstimulated receptors. *J. Immunol.* 159:1703–1710.
- Palazzo, A.F., H.L. Joseph, Y.J. Chen, D.L. Dujardin, A.S. Alberts, K.K. Pfister, R.B. Vallee, and G.G. Gundersen. 2001. Cdc42, dynein, and dynactin regulate MTOC reorientation independent of Rho-regulated microtubule stabilization. *Curr. Biol.* 11:1536–1541.
- Paz, P.E., S. Wang, H. Clarke, X. Lu, D. Stokoe, and A. Abo. 2001. Mapping the Zap-70 phosphorylation sites on LAT (linker for activation of T cells) required for recruitment and activation of signalling proteins in T cells. *Biochem. J.* 356:461–471.
- Ross, J.L., K. Wallace, H. Shuman, Y.E. Goldman, and E.L. Holzbaur. 2006. Processive bidirectional motion of dynein-dynactin complexes in vitro. *Nat. Cell Biol.* 8:562–570.
- Ryser, J.E., E. Rungger-Brandt, C. Chaponnier, G. Gabbiani, and P. Vassalli. 1982. The area of attachment of cytotoxic T lymphocytes to their target cells shows high motility and polarization of actin, but not myosin. *J. Immunol.* 128:1159–1162.
- Sancho, D., M.C. Montoya, A. Monjas, M. Gordon-Alonso, T. Katagiri, D. Gil, R. Tejedor, B. Alarcon, and F. Sanchez-Madrid. 2002a. TCR engagement induces proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2) translocation to the T Cell-APC interface independently of Pyk2 activity and in an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-mediated fashion. *J. Immunol.* 169:292–300.
- Sancho, D., M. Vicente-Manzanares, M. Mittelbrunn, M.C. Montoya, M. Gordon-Alonso, J.M. Serrador, and F. Sanchez-Madrid. 2002b. Regulation of microtubule-organizing center orientation and actomyosin cytoskeleton rearrangement during immune interactions. *Immunity*. 18:84–97.
- Sedwick, C.E., M. Morgan, L. Jusino, J.L. Cannon, J. Miller, and J.K. Burkhardt. 1999. TCR, LFA-1, and CD28 play unique and complementary roles in signaling T cell cytoskeletal reorganization. *J. Immunol.* 162:1367–1375.
- Serrador, J.M., J.R. Cabrero, D. Sancho, M. Mittelbrunn, A. Urzainqui, and F. Sanchez-Madrid. 2004. HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity*. 20:417–428.
- Stinchcombe, J.C., G. Bossi, S. Booth, and G.M. Griffiths. 2001. The immunological synapse of CTL contains a secretory domain and membrane bridges. *Immunity*. 15:751–761.
- Stinchcombe, J.C., E. Majorovits, G. Bossi, S. Fuller, and G.M. Griffiths. 2006. Centrosome polarization delivers secretory granules to the immunological synapse. *Nature*. 443:462–465.
- Sulimenko, V., E. Draberova, T. Sulimenko, L. Macurek, V. Richterova, and P. Draber. 2006. Regulation of microtubule formation in activated mast cells by complexes of gamma-tubulin with Fyn and Syk kinases. *J. Immunol.* 176:7243–7253.
- Vallee, R.B., and S.A. Stehman. 2005. How dynein helps the cell find its center: a servomechanical model. *Trends Cell Biol.* 15:288–294.
- Vallee, R.B., J.C. Williams, D. Varma, and L.E. Barnhart. 2004. Dynein: An ancient motor protein involved in multiple modes of transport. *J. Neurobiol.* 58:189–200.
- Vaughan, K.T. 2005. Microtubule plus ends, motors, and traffic of Golgi membranes. *Biochim. Biophys. Acta*. 1744:316–324.
- Vaughan, K.T., and R.B. Vallee. 1995. Cytoplasmic dynein binds dynactin through a direct interaction between the intermediate chains and p150Glued. *J. Cell Biol.* 131:1507–1516.
- Vicente-Manzanares, M., and F. Sanchez-Madrid. 2004. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol.* 4:110–122.
- Wang, H., F.E. McCann, J.D. Gordan, X. Wu, M. Raab, T.H. Malik, D.M. Davis, and C.E. Rudd. 2004. ADAP-SLP-76 binding differentially regulates supramolecular activation cluster (SMAC) formation relative to T cell-APC conjugation. *J. Exp. Med.* 200:1063–1074.
- Wu, J., Q. Zhao, T. Kurosaki, and A. Weiss. 1997. The Vav binding site (Y315) in ZAP-70 is critical for antigen receptor-mediated signal transduction. *J. Exp. Med.* 185:1877–1882.

Integrin and CD3/TCR activation are regulated by the scaffold protein AKAP450

Javier Robles-Valero,¹ Noa B. Martín-Cófreces,^{1,2} Amalia Lamana,¹ Stephen Macdonald,³ Yuri Volkov,³ and Francisco Sánchez-Madrid^{1,2}

¹Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain; ²Departamento de Biología Vascular e Inflamación, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid, Spain; and ³Department of Clinical Medicine, Trinity College, Dublin Molecular Medicine Centre, Dublin, Ireland

During antigen recognition by T cells, membrane receptors and cytoskeletal molecules form a specialized structure at the T cell–antigen-presenting cell junction called the immune synapse (IS). We report a role for the scaffolding protein A-kinase anchoring protein-450 (AKAP450), a member of the A-kinase anchoring protein family, in IS formation and T-cell signaling in antigen- and superantigen-dependent T-cell activation.

Suppression of AKAP450 by overexpression of a dominant-negative form or siRNA knockdown disrupted the positioning and conformational activation of lymphocyte function-associated antigen 1 at the IS and impaired associated signaling events, including phosphorylation of phospholipase C- γ 1 and protein kinase C- θ . AKAP450 was also required for correct activation and phosphorylation of CD3, LAT, and Vav1, key T-cell

receptor-activated intracellular signaling molecules. Consistently, antigen-triggered reorientation of the microtubule-organizing center at the IS and interleukin-2 secretion were diminished in AKAP450-disrupted T cells. These results indicate key roles for AKAP450 in the organization and activation of receptor molecules at the IS during T-cell signaling events. (*Blood*. 2010;115(21):4174-4184)

Introduction

During the process of antigen recognition by T cells, structural and spatial changes take place at the immune synapse (IS) formed at the contact with antigen-presenting cells (APCs), involving various recognition and signaling molecules as well as cytoskeletal components. In T cells, the IS contains a central supramolecular activation cluster (c-SMAC), which includes the T-cell receptor (TCR)/CD3 complex and various costimulatory receptors, and a peripheral ring (p-SMAC) where molecules, such as lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1) and talin, localize.¹⁻³

The formation of the IS is associated with a substantial remodeling of the actin and tubulin cytoskeleton.^{4,5} An early event on antigen recognition is the translocation of the centrosome, or microtubule-organizing center (MTOC), and the associated Golgi apparatus (GA) and secretory vesicles toward the nascent IS, bringing them in close apposition with the APCs.⁶ This process provides the basis for polarized secretion of various molecules by the T cell, thus favoring controlled communication with the APCs.^{7,8} Moreover, during asymmetric T lymphocyte division, stable orientation of original MTOC is essential to initiate differentiation associated with the adaptive immune responses of T cells.⁹

The physical proximity of the MTOC and GA in mammalian cells is accompanied by a functional link between these organelles. The Golgi protein Golgi Matrix 130 (GM130) has recently been implicated in the regulation of MTOC morphology and function,^{10,11} and Golgi Reassembly Stacking protein 65 (GRASP65) is another Golgi-associated protein required for MTOC/GA remodeling and positioning.¹² The scaffolding protein CG-NAP (centrosome and Golgi localized protein kinase N-associated protein), also known as A-kinase anchoring protein-9 (AKAP9), AKAP450, or AKAP350, is found at the MTOC in most cells but is not

restricted to this location.^{13,14} This molecule is a member of the AKAP (A-kinase anchoring proteins) family and recruits numerous proteins involved in signal transduction. In addition to protein kinases, such as PKA, protein kinase N, or protein kinase C- ϵ (PKC- ϵ), AKAP450 also anchors phosphatases, including protein phosphatase 1 (PP1) and PP2A.^{13,15,16} Specific displacement of endogenous AKAP450 by expression of the AKAP450 C-terminus, which contains the MTOC-targeting domain but not its coiled-coil domains or binding sites for signaling molecules, disrupts centrosomal function and induces cell-cycle arrest at G₁ in HeLa cells, showing defects in cytokinesis.¹⁷ In addition, Ran-GTP, involved in nuclear import and export proteins and microtubule nucleation, associates with AKAP450 at the MTOC.¹⁸ AKAP450 is also a component of the LFA-1-induced signaling complex involved in T-cell migration¹⁹; integrins, particularly LFA-1, are critical for leukocyte migration and for the correct formation of the IS.²⁰ Furthermore, AKAP450 interacts with the dynein/dynactin complex, and this may be involved in the binding of the GA to the MTOC.²¹ Finally, AKAP450 has recently been shown to cooperate with GM130 in microtubule (MT) nucleation at the cis-side of the GA.²²

The molecular mechanisms involved in the reorientation of the MTOC/GA toward the T-APC cell-cell contact remain poorly understood; however, MTOC repositioning after CD3 stimulation is known to be dependent on src kinases and immunoreceptor tyrosine-based activation motif phosphorylation,²³ and the membrane-associated tyrosine kinase Fyn has been reported to play an important role in MTOC translocation on TCR engagement.²⁴ How MTOC repositioning may influence surface receptor organization at the IS architecture and T-cell activation are additional important issues that deserve in-depth studies. Recently, it has been described

Submitted November 25, 2009; accepted February 26, 2010. Prepublished online as *Blood* First Edition paper, March 15, 2010; DOI 10.1182/blood-2009-12-256222.

The online version of this article contains a data supplement.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 USC section 1734.

© 2010 by The American Society of Hematology

that the function of Histone deacetylase 6 (HDAC6)²⁵ and the microtubule motor complex dynein-dynactin²⁶ are key for MTOC/GA relocation, acting as a mechanism to favor the formation of a multimolecular platform connecting TCRs and intracellular signaling proteins that controls T-cell activation.

To further explore the links between the IS formation, T-cell signaling, and the polarized positioning of the MTOC/GA, we have examined the role of AKAP450 in IS organization. Our results show that abolition of AKAP450 function during the formation of the IS disrupts LFA-1 organization and conformational activation into the p-SMAC and is associated with impaired activation of the CD3 complex, alterations to the intracellular signals induced through T-APC contact, and defects in MTOC translocation and interleukin-2 (IL-2) secretion.

Methods

Cells

Jurkat J77c120 (J77) T cells and the lymphoblastoid B-cell lines Raji and HOM-2 were cultured in complete medium (RPMI 1640 and 10% fetal calf serum; Invitrogen). CH7C17 T cells (bearing a hemagglutinin [HA]–peptide-specific V β 3 TCR)²⁶ were cultured in complete medium supplemented with 400 μ g/mL hygromycin B and 4 μ g/mL puromycin. Peripheral blood lymphocytes were isolated from freshly prepared buffy coat from healthy donors, subjected to gradient centrifugation on Histopaque-1077 from Sigma-Aldrich, and followed by 2 rounds of plastic adherence. Human T lymphoblasts were obtained from 10-day culture Staphylococcal Enterotoxin E (SEE)–stimulated peripheral blood lymphocytes. CD4⁺ human primary T cells were isolated by negative selection using AutoMACS cell separation system, following the manufacturer's recommendations (Miltenyi Biotec). The purity of the obtained T cells was analyzed by flow cytometry.

Antibodies and reagents

The primary antibodies used were as follows: T3b (anti–human-CD3) and TP1/55 (anti–human CD69) were produced in the laboratory. A24 rabbit antibody, produced by Dr W. Kemmner (Munich, Germany), was raised against a His-tagged version of the clone 24 coding for chicken AKAP450 and recognizes exons 24 to 27 of the protein. The APA 1/1 and anti-CD3 ζ monoclonal antibodies (mAbs) have been described previously.²⁷ TS2/4 mAb has been described previously.²⁸ m24 and Kim127 mAbs have been described previously.²⁹ The 448 antibody (anti–human CD3) was a kind gift from Dr B. Alarcón (Centro de Biología Molecular). The anti-phosphoVav Y174 mAb was a kind gift from Dr X. Bustelo (Centro de Investigación del Cáncer). JL-8 anti-green fluorescent protein (GFP) and anti–human V β 8 mAbs were from BD Biosciences. Unconjugated and fluorescein isothiocyanate–conjugated anti- α -tubulin, phalloidin, and anti- γ -tubulin mAbs were from Sigma-Aldrich. Anti-PKC- θ (Sc-13 and Sc-18) was from Santa Cruz Biotechnology. Anti-Vav, anti-LAT, anti-phospho-Erk1/2 (T202/Y204), and anti-phospho-LAT (Y191) were from Millipore. Anti-phospho-LAT (Y132) and anti-giantin were from Abcam. Anti-phospho-phospholipase C- γ 1 (PLC- γ 1) (Y783), anti-PLC- γ -1, and anti-phospho-PKC- θ (T538) were from Cell Signaling. Anti-phospho-CD3 ζ (Y83) was from Epitomics.

Human fibronectin (FN) and poly-L-lysine (PLL) were from Sigma-Aldrich, SEE from Toxin Technology, puromycin from InvivoGen, and hygromycin B from Roche Diagnostics. Anti-Erk 1/2 and the fluorescent secondary antibodies (Alexa 568 and 647, and rhodamine red X) and cell trackers (7-amino-4-chloromethylcoumarin [CMAC], 5-(and-6)-((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine) were obtained from Invitrogen. Propidium iodide was from Sigma-Aldrich. All other reagents were of the purest grade available.

Recombinant DNA constructs and cell transfection

The cDNA encoding the C-terminal GFP-linked CG-NAP/AKAP450 construct has been described.¹⁹ The indicated cDNAs were transiently transfected into T cells (2×10^7) with the Bio-Rad Gene Pulser II electroporation system. At 16 hours after transfection, viable J77 or CH7C17 cells were isolated by centrifugation on a Ficoll-Hypaque gradient. Primary T cells and human T lymphoblasts were transfected with Nucleofector electroporation-based system from Amaxa Biosystems following the manufacturer's recommendations.

siRNA experiments

J77 or CH7C17 T cells were electroporated twice (at 0 and 72 hours) with a double-stranded siRNA (21 bp) against AKAP450 (5'-AACUUU-GAAGUUAACUAUCA-3'; Eurogentec) at a final concentration of 20 μ M per sample. Cells were then collected, and the efficiency of gene silencing was assessed by Western blot. Control-transfected cells (siRNA-negative; Eurogentec) were used as a negative control. Cells were used for experiments on day 6.

Cell conjugate formation and immunofluorescence analysis

CMAC-loaded Raji B cells were incubated in Hanks balanced salt solution for 30 minutes with or without 0.5 μ g/mL SEE, centrifuged at low speed, and allowed to form conjugates with J77 Jurkat cells or SEE-CD4 human primary T cells for 20 minutes at 37°C. HOM-2 cells were also loaded with CMAC, incubated for 2 hours with 50 μ g/mL HA peptide, and allowed to form conjugates with CH7C17 cells. In these assays, the T cells (2×10^5) were mixed with an equal number of APCs in a final volume of 80 μ L, gently resuspended, and plated onto slides coated with PLL (Jurkat) or FN (CH7C17). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde in PHEM/saccharose and permeabilized when needed for 5 minutes in 2% paraformaldehyde and 0.2% Triton X-100 in PHEM/saccharose, blocked, and stained with the indicated Abs.²⁶ Stained cells were mounted in a Mowiol-based mounting solution (ProLong Gold antifade reagent; Invitrogen) and observed at room temperature under Leica DMR photomicroscope fitted with an HCX PL APO 63 \times /1.32-0.6 oil objective (Leica Microsystems) coupled to a COHU 4912-5010 charge-coupled camera. The acquisition software was QFISH V2.1 (Leica), and images were processed with Photoshop CS (Adobe Systems). Alternatively, cells were analyzed at 18°C with a confocal laser scanning unit (TCS SP5; Leica) attached to an inverted epifluorescence microscope (DMI6000; Leica) fitted with an HCX PL APO 63 \times /1.40-0.6 oil objective. Images were acquired and processed with accompanying confocal software (LCS; Leica) or WCIF ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Three-dimensional maximal projections of the T-cell/APC contact area were generated with the ImageJ to obtain a z stack projection. Figures were composed with Photoshop CS.

Analysis of active LFA-1, CD3, and PKC- θ accumulation at the T-APC contact area

T-APC conjugates were formed between GFP or C-term AKAP450-GFP T cells and HA- or SEE- loaded APCs, and processed with ImageJ software. Using region of interest of the same area for all measurements, we quantified the signal generated by the T-APC interaction at the contact area (IS), the signal at the area of APC membrane not in contact with the T cell (B), at the area of T-cell membrane not in contact with the APC (T), and the background (Bg). We first subtracted the Bg signal from the other measurements and then obtained ratio of the corresponding protein at the IS in relation to the rest of the T cell, according to the formula (IS – B)/T. We assumed that protein accumulation was homogeneous in the APCs, with no additional accumulation at the contact zone with the T cell.

Time-lapse fluorescence confocal microscopy

Raji APCs (5×10^5 ; SEE-pulsed or controls) were allowed to adhere on FN-coated coverslips. The cells were maintained in 1 mL of Hanks balanced salt solution (2% bovine serum albumin) in Attofluor open chambers (Invitrogen) at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere, and placed on the

microscope stage. Jurkat T cells (5×10^5) were added, and a series of fluorescence and differential interference contrast frames were captured simultaneously every 30 seconds using a TCS SP5 confocal laser scanning unit attached to an inverted epifluorescence microscope (DMI6000) with an HCX PL APO 63 \times /1.40-0.60 oil objective. Images were acquired with the accompanying confocal software (LCS; Leica) and processed with ImageJ software. Premiere 6.0 software (Adobe) was used for generating QuickTime videos (Apple).

MTOC translocation and functional assays

T cells were mixed with Raji or HOM-2 cells at a 1:1 ratio for 15 minutes at 37°C. Cell conjugates were gently resuspended, plated onto PLL- or FN-coated coverslips for an additional 15 minutes, and processed for immunofluorescence. The MTOC was scored as reoriented when it was located in close proximity to the T-cell plasma membrane at the contact area with the APCs. At least 300 cell conjugates were scored in each experiment. Results are expressed as the percentage of conjugates with MTOC reoriented to the contact area.

For IL-2 production and CD69 expression assays, conjugates were formed and cultured in flat-bottom, 96-well plates. Culture supernatant was harvested after 16-hour culture and analyzed for IL-2 concentration by enzyme-linked immunosorbent assay (Diaclone, Gen-Probe-TDI). T cells from these cultures were analyzed for CD69 expression by flow cytometry using a FACSCalibur flow cytometer and were processed with CellQuest Pro 4.0.2 software (BD Biosciences).

Immunoblotting

For analysis of protein phosphorylation during formation of the IS, Raji or HOM-2 cells (1×10^6) were preloaded with 0.5 μ g/mL SEE (30 minutes) or 50 μ g/mL HA peptide (2 hours) at 37°C and mixed with 5×10^6 Jurkat or CH7C17 cells at 37°C, respectively. Cells were lysed at 4°C (40 minutes) in 50mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 1% NP-40, 0.2% Triton X-100, 150mM NaCl, and phosphatase and protease inhibitors. Cell lysates were spun at 2500g (10 minutes) to remove cell debris and nuclei. Whole lysates were analyzed by sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), transferred to nitrocellulose membranes, and probed with the indicated antibodies in Tris-buffered saline–Tween 20. Bound antibodies were reacted with horseradish peroxidase secondary antibodies, and membranes were developed by enhanced chemiluminescence with Super-Signal West Pico or Femto chemiluminescent substrate (Pierce Chemical). Densitometric analyses were performed with ImageGauge 3.46 software (Fujifilm).

Statistical analysis

Data were tested for normality using the D'Agostino-Pearson omnibus normality test. Differences between means were tested by Student *t* test for normal data, whereas no normal data were analyzed using the Mann-Whitney test. Significant differences are considered with a *P* value of less than .05.

Results

AKAP450 is required for the positioning and activation of LFA-1 at p-SMAC of IS

The formation and maturation of the IS involve the respective clustering of CD3 and LFA-1 at the c-SMAC and p-SMAC.¹ To assess the possible role of AKAP450 in SMAC organization, we overexpressed a dominant-negative form of AKAP450 in T cells. The dominant-negative form, composing the GFP-tagged AKAP450 C-terminus, affects neither the expression of endogenous AKAP450 (supplemental Figure 1A, available on the *Blood* Web site; see the Supplemental Materials link at the top of the online article) nor the cell cycle of the T cells (supplemental Figure 1B) and colocalizes

with γ -tubulin in MTOC (supplemental Figure 1C). CD3 and LFA-1 localization in T cell–APC conjugates was analyzed by confocal fluorescence microscopy. The number of total cell conjugates formed was quantified. No significant differences were found between GFP and C-term AKAP450–GFP–expressing cells (supplemental Figure 1D). CD3 was apparently localized at the central area of the IS in both control GFP and C-term AKAP450–GFP cells (Figure 1A). Analysis of LFA-1 showed that it was not clearly separated from the c-SMAC in cells expressing C-term AKAP450–GFP, and 3-dimensional reconstruction confirmed that the LFA-1 p-SMAC ring was deformed in these cells (Figure 1A). Fluorescence histograms confirmed that LFA-1 overlapped with CD3 at the c-SMAC in C-term AKAP450–GFP cells (histograms in Figure 1A), consistent with the view that AKAP450 functionality might be necessary for correct segregation of this integrin to the p-SMAC. Quantitative analysis of LFA-1 alteration at the IS is shown (graph in Figure 1A). The expression levels of LFA-1, β 1 integrins, TCR/CD3, CD4, and other IS markers were unaffected by C-term overexpression (data not shown). Further studies with conjugates of human T lymphoblasts and SEE-pulsed Raji cells (APCs) confirmed that the LFA-1 ring was also altered after C-term expression (Figure 1B; the effect was quantified and results are displayed in the graph).

To further characterize the role of AKAP450 in the correct configuration of p-SMAC, we next analyzed the level of activation of the LFA-1 molecule in T cell–APC conjugates by confocal microscopy. Binding of ligands to the extracellular domains of integrins initiates intracellular signaling (outside-in signal) and induces conformational changes in both the extracellular and the cytoplasmic domains. m24 and KIM127 are 2 mAbs that recognize the activated β 2 I-like domain and the EGF2 domain in the leg of the β 2 subunit,^{29,30} respectively, and they recognize both ligand-bound and -unbound active conformations of LFA-1. Immunofluorescence analysis of C-term AKAP450 T cell–APC conjugates showed a reduction in the level of activated LFA-1 (m24 and KIM127) compared with controls, which correlates with the defective segregation of LFA-1 at the p-SMAC ring (Figure 1C). Quantitative analysis of control CH7C17–HOM-2 conjugates showed that stimulation of T cells caused a 2.4-fold increase in m24 levels compared with a 1.1-fold increase in C-term AKAP450–GFP conjugates (graph in Figure 1C); similar results were obtained in KIM127 staining (3.2-fold increase in control cells compared with 1.4-fold increase in C-term AKAP450–GFP cells; graph in Figure 1C). Together, these data suggest the implication of AKAP450 in the correct activation of LFA-1 at IS.

Suppression of AKAP450 function impairs the signaling events related with the activation of LFA-1

It has been described that LFA-1 signaling includes many events, such as phosphorylation of PLC- γ 1 and activation of different kinases, such as isoenzymes of PKC and tyrosine kinases.^{31–33} To examine the potential role of AKAP450 in these signaling events, we assessed intracellular pathways during T-APC conjugate formation on antigen stimulation. Time-course activation experiments revealed that the phosphorylation of PLC- γ 1 was significantly diminished in C-term AKAP450 J77-Raji APC conjugates (Figure 2A).

To further explore the role of AKAP450 in LFA-1 signaling, its expression in J77 and CH7C17 cells was suppressed by siRNA knockdown. AKAP450-interfered T cells showed a significant (65%–75%) reduction in AKAP450 expression (supplemental Figure 2A–B). In this case, we have analyzed the phosphorylation of

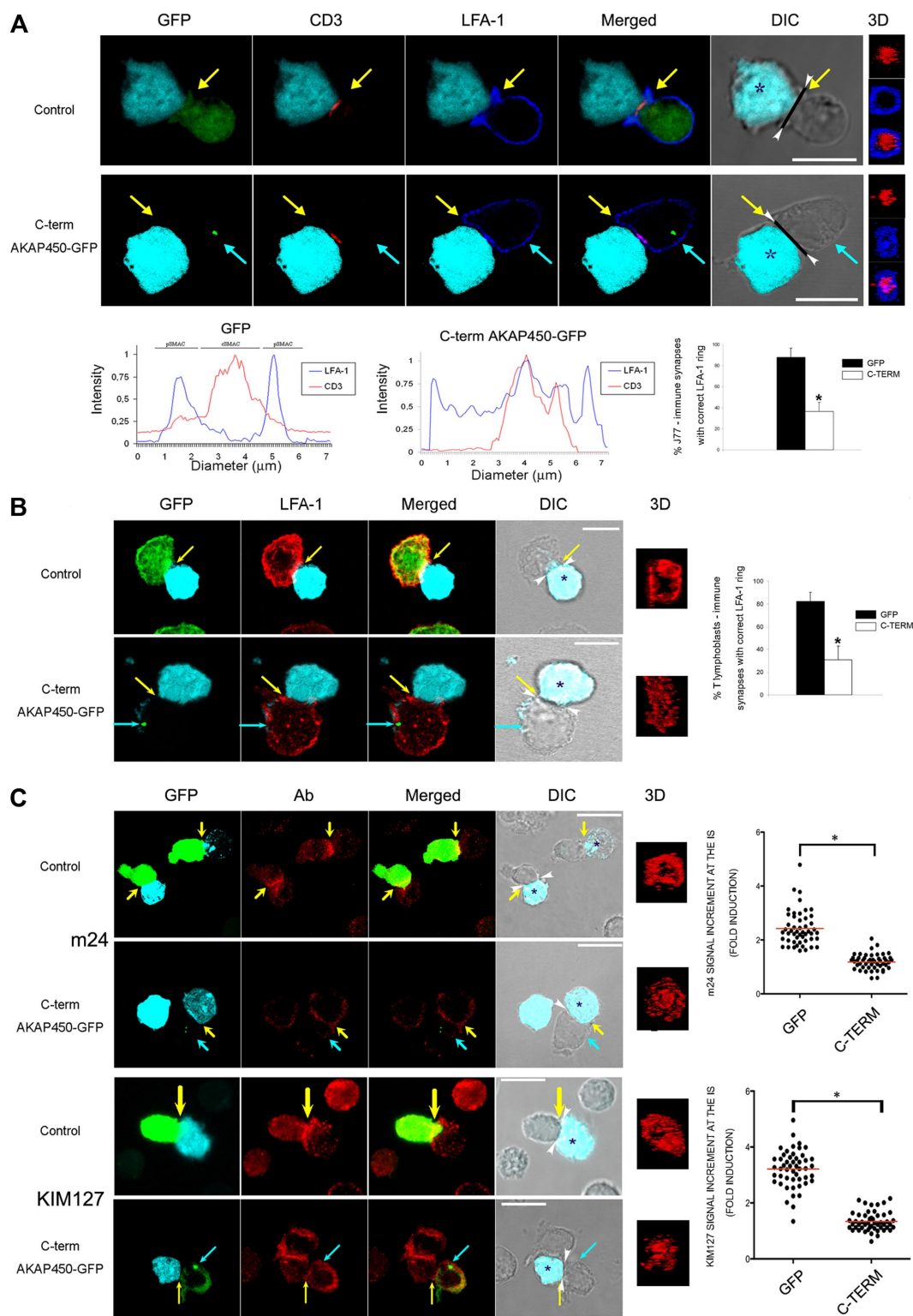


Figure 1. AKAP450 is required for the correct configuration and activation of LFA-1 at the IS. (A) J77 cells expressing GFP or C-term AKAP450-GFP were incubated with SEE-pulsed Raji B cells. Conjugates were stained with antibodies to LFA-1 (blue) and CD3 ζ (red). Confocal z slices and corresponding 3-dimensional reconstruction of SMAC area (right) are shown. Histograms show the fluorescence intensity profiles of staining for CD3 (red) and LFA-1 (blue) along the diagonal black lines in the DIC images. Graph represents quantification of immune synapse with LFA-1 ring showing correct architecture. Data are the arithmetic mean \pm SD of correct LFA-1 segregation. $^*P < .05$ compared with J77 cells transfected with GFP (Student *t* test). (B) T lymphoblasts expressing GFP or C-term AKAP450-GFP were incubated with SEE-pulsed Raji B cells. Conjugates were stained with antibodies to LFA-1 (red). Confocal z slices and corresponding 3-dimensional reconstruction of SMAC area (right) are shown. Scale bars represent 10 μm . Graph represents quantification of immune synapse with LFA-1 ring showing correct architecture. Data are the arithmetic mean \pm SD of correct LFA-1 segregation. $^*P < .05$ compared with J77 cells transfected with GFP (Student *t* test). (C) Cell conjugates were formed between CH7 cells expressing GFP or C-term AKAP450-GFP and HA-stimulated HOM-2 APCs. Cells were stained with the antibodies to active conformation of LFA-1 (red), m24 (top panel), and KIM127 (bottom panel). A confocal z section of conjugates formed and processed as in panel A is shown (3-dimensional). Quantification of the active LFA-1 accumulation (m24, top panel; KIM127, bottom panel) at the IS. A total of 50 conjugates were counted for each condition. $^*P < .01$ compared with CH7C17 cells transfected with GFP control (Mann-Whitney test). (A-C) Arrowheads in DIC images indicate the cell-cell junction selected for 3-dimensional projection. Yellow arrows indicate the positions of immune synapses; blue arrow, the position of the mislocalized MTOC in cells overexpressing C-term AKAP450-GFP. Asterisks in DIC images identify CMAC-loaded Raji APCs. Scale bars represent 10 μm .

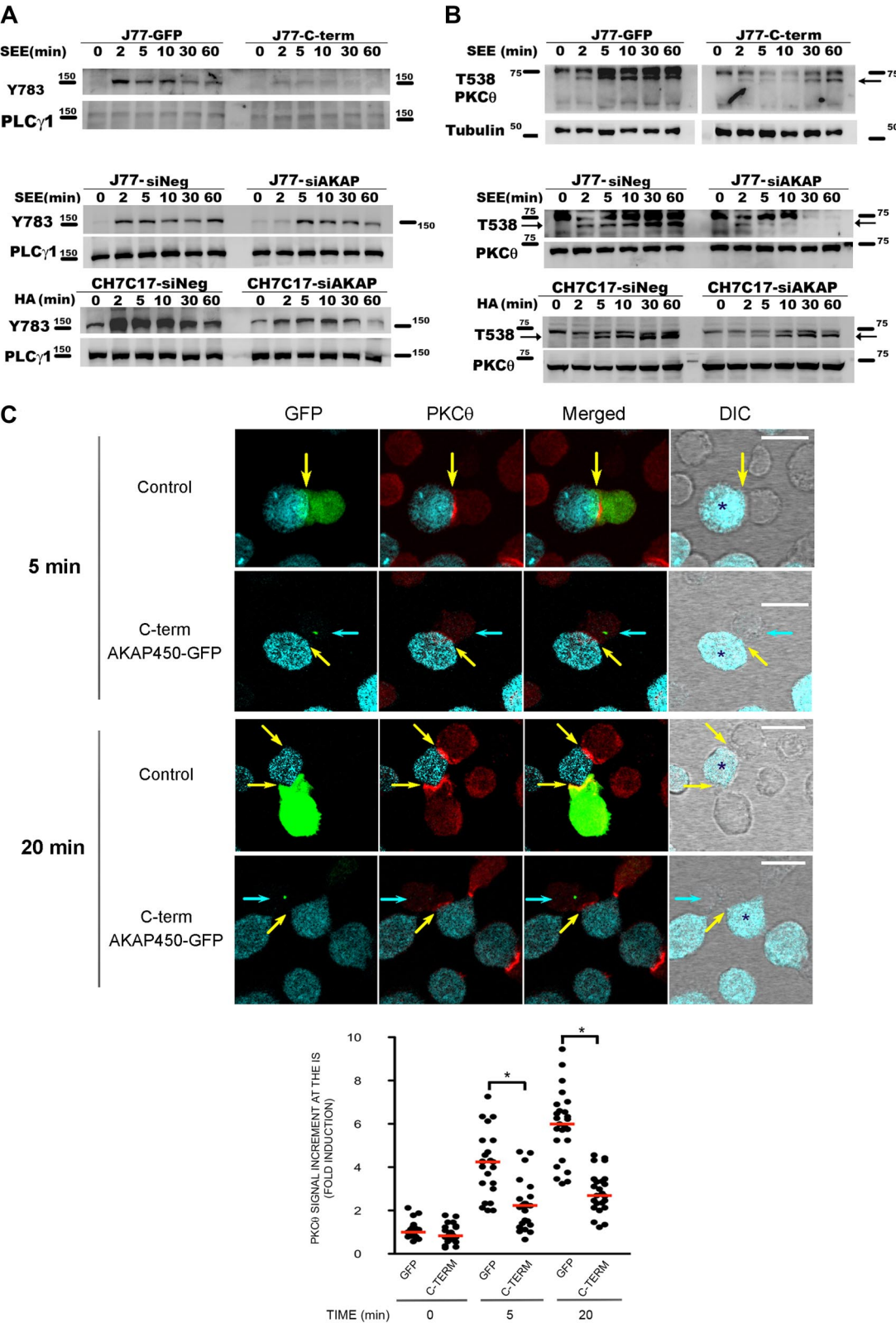


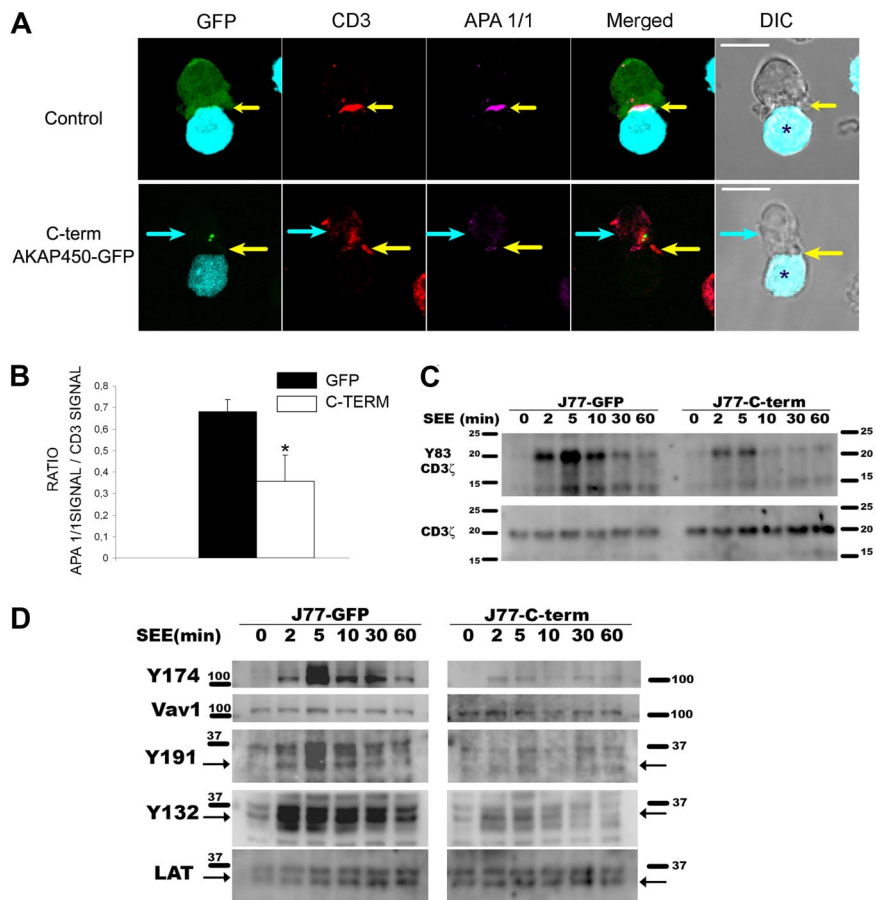
Figure 2.

PLC- γ 1 at Y783, and similar results were obtained in AKAP450-interfered J77 and CH7C17 cells stimulated with SEE-pulsed Raji and HA-pulsed HOM-2 APCs, respectively (Figure 2A). Subsequently, we analyzed the activation of PKC- θ , and the phosphorylation of this protein in AKAP450-targeted T cells was decreased

compared with the control cells (Figure 2B). Moreover, PKC- θ recruitment to the IS was also impaired by C-term AKAP450-GFP overexpression (Figure 2C). The analysis of conjugates at early times on cell-cell contact (5 minutes) showed that the recruitment of PKC- θ is defective from the initiation of IS formation (Figure

Figure 3. Overexpression of C-term AKAP450-GFP impairs the activation of the TCR/CD3 complex and T-cell signaling molecules. (A) Conjugates were formed between J77 cells expressing GFP or C-term AKAP450-GFP and SEE-pulsed Raji B cells, and were stained for CD3 ζ (red) and activated CD3 ϵ (APA1/1: magenta).

Yellow arrows indicate the positions of immune synapses; blue arrow, position of the mislocalized MTOC in cells overexpressing C-term AKAP450-GFP. Asterisks in DIC images identify CMAC-loaded Raji APCs. Scale bars represent 10 μ m. (B) Histogram shows quantification of the relation between APA1/1 signal and CD3 signal in conjugates formed as in panel A. A total of 50 conjugates were counted for each condition. Results are the arithmetic mean \pm SD. * P < .05 compared with J77 cells transfected with GFP control (Student t test). (C) Representative Western analysis of phospho-CD3 ζ (Y83) in J77/SEE-pulsed Raji cell conjugates as in panel A, formed for the indicated times. Total CD3 expression was detected as a loading control. One of 4 representative experiments is shown. (D) J77 expressing GFP (J77-GFP) or C-term AKAP450-GFP (J77-C-term) were conjugated with SEE-pulsed Raji cell for the times indicated, and cell proteins were separated by SDS-PAGE and processed for Western blotting. Blots show the phosphorylation of specific sites on Vav1 (Y174) and LAT (Y191, Y132) together with the total expression of these proteins. Arrows indicate target band sizes. One of 4 experiments is shown.



2C). This effect was also observed at later times (20 minutes; Figure 2C), correlating with the observed reduction in the phosphorylation at PKC- θ Thr538 (Figure 2B). The defective phosphorylation of PLC- γ 1 and PKC- θ observed in AKAP450-disrupted cells suggests a defect in costimulation and integrin signaling at the IS, in accordance with the defective activated conformation and architecture of LFA-1 at the p-SMAC.

Dominant-negative AKAP450 impairs activation of the TCR-CD3 complex and alters signaling downstream of the TCR

It has been described that adhesion molecules, such as LFA-1 and ICAM-1, initially localize to the central contact area in T-APC conjugates preceding the TCR/CD3 complex, and then dynamically relocates to the p-SMAC.² Because we found an abnormal LFA-1 configuration at the p-SMAC, we decided to study the activation of the TCR/CD3 complex at the c-SMAC. When T cells specifically interact with APCs,

the CD3 ϵ chain undergoes a conformational change that can be detected with the APA1/1 mAb.²⁷ Immunofluorescence analysis of C-term AKAP450 T cell-APC conjugates showed a clear reduction in the staining for activated CD3 ϵ compared with controls, in which there was a complete colocalization of total CD3 and activated CD3 ϵ staining (Figure 3A). To quantify this effect, we measured the ratio between APA 1/1 and CD3 signal detected in the contact area in T-APC conjugates by confocal microscopy, showing a clear reduction in the APA 1/1 signal in C-term AKAP450-GFP cells with respect to CD3 signal (Figure 3B). Consistently, C-term AKAP450-GFP overexpression impaired tyrosine phosphorylation of CD3 ζ (Y83) in the TCR/CD3 complex of SEE-stimulated Jurkat cells (Figure 3C).

These results prompted us to study how different TCR/CD3-emanating signaling pathways are affected by disruption of the AKAP450 function. We next examined the specific phosphorylation of molecules known to be important for T-cell activation.

Figure 2. Disruption of AKAP450 function impairs the phosphorylation of different molecules associated with the activation of LFA-1. (A) Top blot: J77 expressing GFP (J77-GFP) or C-term AKAP450-GFP (J77-C-term) were conjugated with SEE-pulsed Raji cell for the times indicated, and a representative Western blot of phospho-PLC- γ 1 (Y783) is shown. Total PLC- γ 1 expression was detected as a loading control. Bottom blots: J77/SEE-pulsed Raji cell conjugates and CH7C17/HOM-2 conjugates expressing control siRNA (siNeg) or AKAP450 siRNA (siAKAP). Control and AKAP450 knockdown T cells were conjugated as in panel A, and representative Western blots of phospho-PLC- γ 1 (Y783) are shown. Total PLC- γ 1 expression was detected as a loading control. One of 4 representative experiments is shown. (B) Top blot: J77 expressing GFP (J77-GFP) or C-term AKAP450-GFP (J77-C-term) were conjugated as in panel A, and a representative Western blot of phospho-PKC- θ (T538) is shown. Total PKC- θ expression was detected as a loading control. Bottom blots: J77/SEE-pulsed Raji cell conjugates and CH7C17/HOM-2 conjugates expressing control siRNA (siNeg) or AKAP450 siRNA (siAKAP). Control and AKAP450 knockdown T cells were conjugated as in panel A, and representative Western blots of phospho-PKC- θ (T538) are shown. Total PKC- θ expression was detected as a loading control. One of 4 representative experiments is shown. (C) Conjugates were formed between J77 cells expressing GFP or C-term AKAP450-GFP and SEE-pulsed Raji B cells for the different times (5 minutes, top panel; 20 minutes, bottom panel), and were stained for PKC- θ (red). Yellow arrows indicate the positions of immune synapses; blue arrow, position of the mislocalized MTOC in cells overexpressing C-term AKAP450-GFP. Asterisks in DIC images identify CMAC-loaded Raji APCs. Scale bars represent 10 μ m. The graph shows the quantification of the total PKC- θ accumulation for the times indicated at the IS. A total of 25 conjugates were counted for each time and condition. Data are the arithmetic mean \pm SD of PKC- θ accumulation. * P < .05 compared with J77 cells transfected with GFP (Student t test).

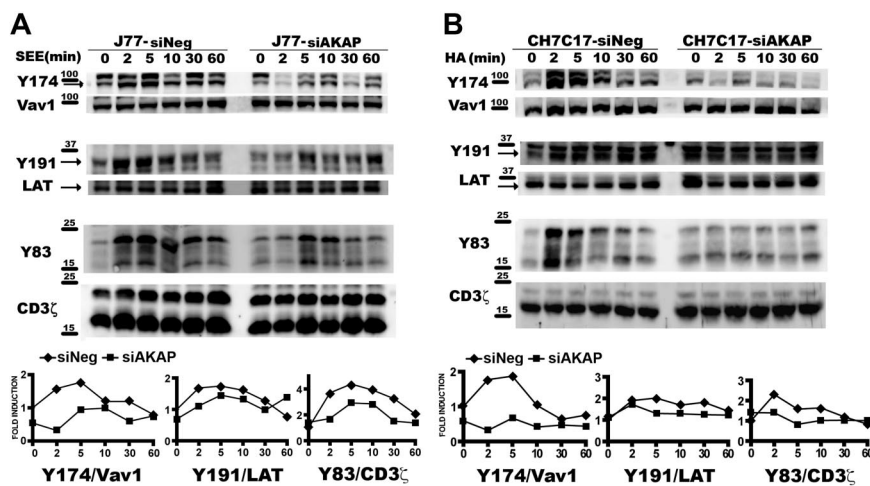


Figure 4. AKAP450 knockdown impairs the activation of T-cell signaling molecules. J77/SEE-pulsed Raji cell conjugates (A) and CH7C17/HOM-2 conjugates (B) expressing control siRNA (siNeg) or AKAP450 siRNA (siAKAP). Control and AKAP450 knockdown T cells were conjugated as in Figure 3D. Cell proteins were separated by SDS-PAGE and processed for Western blotting. Blots show the phosphorylation of specific sites on Vav1 (Y174), LAT (Y191), and CD3ζ (Y83) together with the total expression of these proteins. Arrows indicate target band sizes. Graphs correspond to the densitometric analysis of the Western blots in panels A and B. One of 4 experiments is shown.

Phosphorylation of LAT was observed initially after SEE stimulation but, in contrast to control cells, was not sustained for longer periods and significantly diminished in C-term AKAP450 and AKAP450-interfered SEE-specific J77-Raji APC conjugates (Figures 3D,4A). We also analyzed the activation of Vav1, which is linked to LAT phosphorylation at Y191.³⁴ Phosphorylation of this signaling protein was reduced in AKAP450-disrupted cells, correlating with the timing of LAT phosphorylation (Figures 3D,4A). Subsequently, F-actin content was analyzed in T cells by flow cytometry and confocal microscopy. In C-term AKAP450 Jurkat and CD4 primary human T cells, a defective actin polymerization response to TCR/CD3 crosslinking was observed (supplemental Figure 3A), and immunofluorescence analysis of C-term AKAP450 T cell-APC conjugates showed a reduction in F-actin levels compared with controls (supplemental Figure 3B), which correlates with the defective activation of Vav1. Defective phosphorylation of CD3ζ (Y83), LAT (Y191), and Vav1 (Y174) was also detected in AKAP450-interfered CH7C17 cells stimulated with HA-pulsed HOM-2 APCs (Figure 4B), compared with the control cells, which is parallel to what occurred in C-term AKAP450-GFP cells (Figure 3D).

Suppression of AKAP450 function prevents MTOC translocation toward the IS

AKAP450 is located at the GA and MTOC and controls centrosome function during cell cycle,¹⁷ Golgi organization,³⁵ and microtubule nucleation²² in adherent epithelial cells and fibroblasts. However, in T lymphocytes, AKAP450 targeting with the C-term AKAP450-GFP construct did not significantly affect the cell-cycle progression and Golgi structure/organization by confocal level (supplemental Figures 1B, 4). We next assessed the possible role of AKAP450 in the polarization of the MTOC to the contact between the T cell and APC. Overexpression of C-term AKAP450 delocalized the MTOC from the contact area between J77 cells and SEE-preloaded Raji B cells (Figure 5A top panel). C-term AKAP450 had a similar effect in an antigen peptide-specific model of the IS, in which CH7C17 T cells specifically recognize HA-pulsed HOM-2 APCs (Figure 5A bottom panel). Quantitative analysis of SEE-stimulated Jurkat cells showed that only 39% of C-term AKAP450-GFP expressing cells displayed their MTOC at the IS, compared with nearly 82% of GFP-transfected control cells (graph in Figure 5A). Similar results were obtained in T cells conjugated with HA-pulsed HOM-2 APCs, with MTOC orientation detected in only 37% of CH7C17 cells expressing C-term AKAP450-GFP, com-

pared with 78% of GFP-expressing controls (graph in Figure 5A). In the case of human T lymphoblasts, the translocation of the MTOC toward the contact area with the APCs was also affected by C-term AKAP450-GFP expression (Figure 5B). To more precisely investigate this, we monitored the MTOC movement in Jurkat cells by time-lapse confocal videomicroscopy. The MTOC translocation in C-term AKAP450-GFP expressing cells was not evident, showing no effective rearrangement toward the IS (Figure 5C, M1; and supplemental Video 1). In contrast, in the case of control cells overexpressing paxillin-GFP,³⁶ the MTOC translocated directly to the IS within the first 5 minutes (Figure 5C, M2; and supplemental Video 2). In accordance, the GA was similarly not reoriented toward the IS in T cells expressing C-term AKAP450, and remained well organized around the MTOC (supplemental Figure 4).

Furthermore, analysis of AKAP450-interfered T cell-APC conjugates revealed an inhibition of MTOC translocation comparable with that observed with the dominant-negative C-term AKAP450 (Figure 6). Together, these data show that AKAP450 is required for the APC-induced polarization of the T-cell MTOC.

Suppression of AKAP450 function impairs IL-2 release during the formation of the IS

One of the first events on TCR activation is a polarized release of IL-2 by T lymphoblasts.³⁷ The production of IL-2 is dependent on the activation of the mitogen-activated protein kinase (Erk 1/2) pathway.⁵ As a measure of the sustained activation of T cells, phosphorylation of ERK 1/2 was assessed in cell extracts from AKAP450-disrupted cells. A strong reduction in protein phosphorylation was observed in these cells (Figure 7A-B). In accord, both AKAP450 knockdown and C-term AKAP450-GFP overexpression considerably impaired IL-2 release, detectable as early as 16 hours after cell conjugate formation (Figure 7C-D). In contrast, CD69 surface expression was not significantly affected (Figure 7E-F).

Discussion

Several scaffolding proteins have been documented to play important roles in orchestrating the molecular reorganization at the T-cell side of the IS, either through the spatiotemporal targeting of effector kinases and phosphatases or by providing sites for the docking of cell surface proteins to cytoskeletal components.³⁸ Among these scaffolding proteins, AKAP proteins have been shown to be important for the maintenance of T-cell homeostasis.³⁹

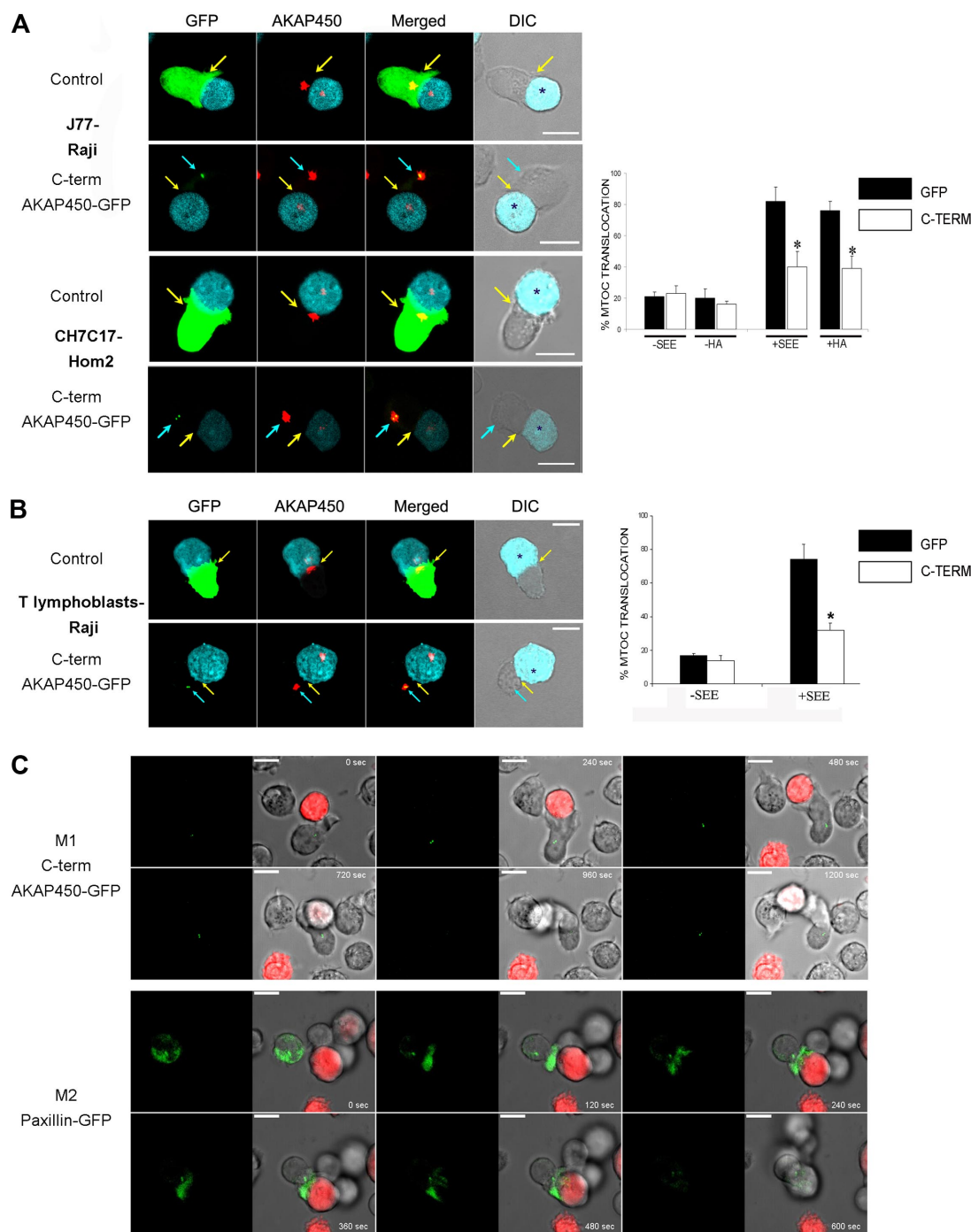


Figure 5. MTOC polarization is prevented by C-term AKAP450-GFP expression. (A) Top panel: Cell conjugates were formed between J77 cells expressing GFP (control) or C-term AKAP450-GFP and SEE-stimulated Raji B cells. Cells were stained for endogenous AKAP450 (red). Bottom panel: Cell conjugates were formed between CH7C17 cells expressing GFP (control) or C-term AKAP450-GFP and HA-stimulated HOM-2 APC. Cells were also stained for endogenous AKAP450. Yellow arrows indicate the positions of immune synapses; blue arrow, position of the mislocalized MTOC in cells overexpressing C-term AKAP450-GFP. Asterisks in DIC images identify CMAC-loaded Raji APCs. Scale bars represent 10 μ m. Quantification of MTOC translocation in conjugates formed is shown in the graph. More than 300 conjugates were counted for each condition. Data are the arithmetic mean \pm SD of MTOC translocation. * P < .05 compared with J77 or CH7C17 cells transfected with GFP (Student t test). (B) T lymphoblasts were incubated with SEE-pulsed Raji cells loaded with CMAC cell tracker (cyan), fixed, and stained for endogenous AKAP450 (red) as in panel A. Top panel: GFP-expressing T lymphoblasts. Bottom panel: C-term AKAP450-GFP expressing T lymphoblasts. Yellow arrows indicate the positions of immune synapses; blue arrow, position of the mislocalized MTOC in cells overexpressing C-term AKAP450-GFP. Asterisks in DIC images identify CMAC-loaded Raji APCs. The graph shows the quantification of MTOC translocation in conjugates. More than 50 conjugates were counted for each condition. Data are the arithmetic mean \pm SD of MTOC translocation. * P < .05 compared with T lymphoblast cells transfected with GFP (Student t test). (C) J77 cells expressing C-term AKAP450-GFP (M1) or paxillin-GFP (M2) were incubated with SEE-pulsed Raji B cells loaded with 5-(and-6)-(((4-chloromethyl)benzoyl)amino)tetramethylrhodamine cell tracker (red) and time-lapse confocal video microscopy sequences are shown at the time indicated. Images were captured at 37°C. Time is shown in seconds. M indicates movie. Scale bars represent 10 μ m.

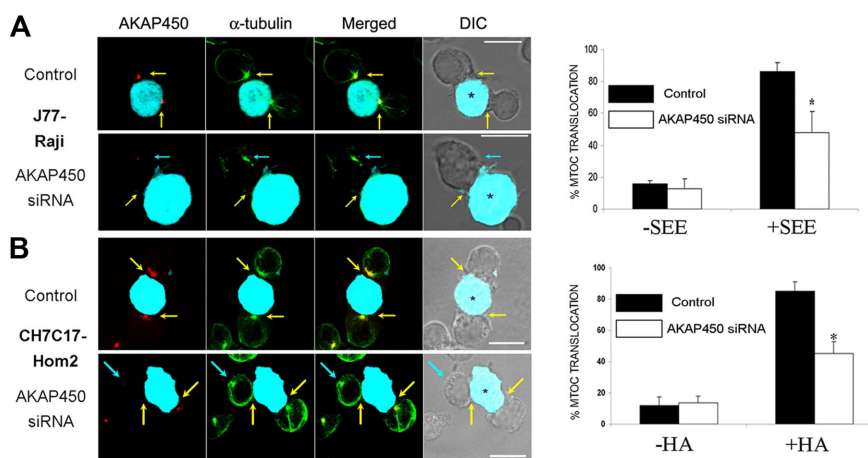


Figure 6. Defective MTOC polarization in AKAP450 knockdown cells. J77 cells (A) and CH7C17 cells (B) were transfected with a control siRNA or AKAP450 siRNA, and cell conjugates were formed as in Figure 5A. Conjugates were stained for endogenous AKAP450 (red) and α -tubulin (green). Yellow arrows indicate the positions of immune synapses; blue arrows, position of the mislocalized MTOC in AKAP450 knockdown cells. CMAC-labeled SEE-pulsed Raji and HA-pulsed HOM-2 APCs are distinguished by cyan fluorescence in DIC images (*). Scale bars represent 10 μ m. (A-B) Histograms show quantification of MTOC translocation in (A) J77 and (B) CH7C17 cells. More than 200 conjugates were counted for each condition. Results are the arithmetic mean \pm SD of MTOC translocation. Control incubation with unloaded APCs represented as -SEE and -HA in the graphs. * P < .05 compared with T cells transfected with control siRNA (Student t test).

In this study, we examined the potential role of AKAP450, which links the GA to the MTOC, in integrin and TCR/CD3 molecular reorganization and signaling leading to MTOC translocation to the IS during T cell-APC interaction. Our results show that conformational activated states of LFA-1 and TCR/CD3 molecules as well as the subsequent signaling events are impaired by AKAP450 targeting. As consequence, MTOC translocation is prevented by siRNA suppression of AKAP450 expression or by displacement of the endogenous protein with a dominant-negative mutant form.

In migrating T cells, AKAP450 nucleates several proteins at LFA-1 clusters, such as PKC- β and PKC- δ .¹⁹ Our data demonstrate that AKAP450 supports LFA-1 organization and activation at the IS. The p-SMAC is not well organized in a ring-shaped cluster but instead appears as poorly stained with irregular aggregation of integrin molecules at the T cell-APC interface. Together, these data indicate that AKAP450 plays a role in IS formation, the consequence of which is the observed defect in MTOC translocation. The abnormal configuration of the p-SMAC on disruption of AKAP450 function might prevent MTOC anchorage at the IS, thereby delocalizing it from the T cell-APC contact area. Considering that

the integrin- and actin-enriched p-SMAC associates with microtubules during IS formation,⁴⁰ the possibility that LFA-1 and other p-SMAC-localized integrins, such as VLA-4,⁴¹ might act as MTOC-docking sites is an attractive hypothesis that warrants investigation. Accordingly, our data show a reduction in the staining with the m24 and KIM127 mAbs, 2 antibodies that recognize active conformation of LFA-1.^{29,30} Together with the observed defect in MTOC translocation, we have found a defect in actin polymerization on TCR/CD3 stimulation, which correlates with the lack of integrin and CD3 activation in AKAP450 disrupted cells. This experimental evidence underscores the role of AKAP450 in the initial activation of integrin receptors and the remodeling of the cytoskeleton at the IS, necessary for late events in T-cell activation, such as the IL-2 production.³⁷

The defective phosphorylation of PLC- γ 1 and PKC- θ in AKAP450-disrupted cells suggests a defect in costimulation and integrin signaling at the IS, which agrees with the defective architecture of LFA-1 at the p-SMAC we observed. The defective recruitment of PKC- θ to the IS in AKAP450-disrupted cells might indicate direct interaction between these molecules, as previously

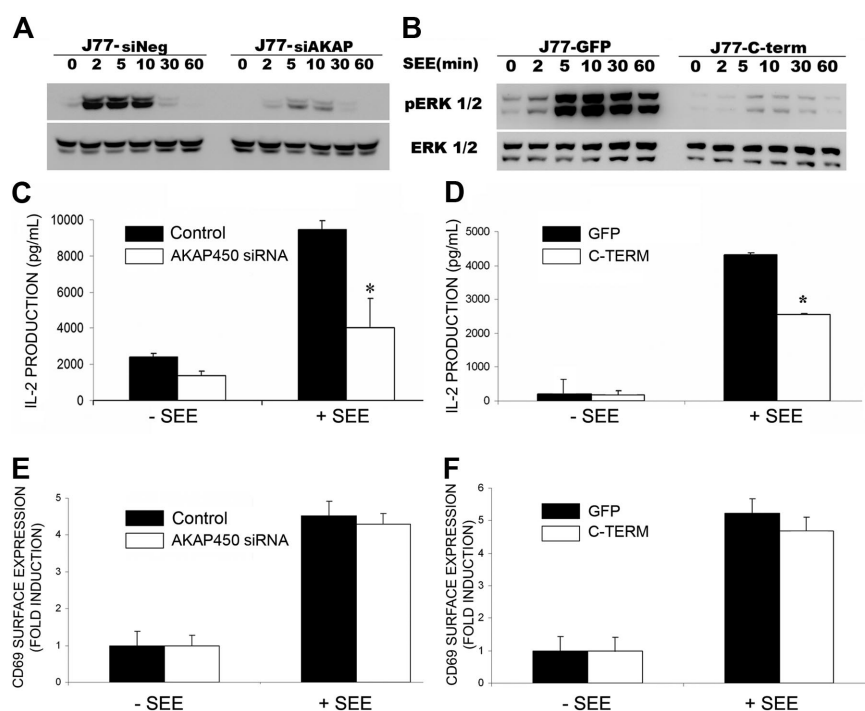


Figure 7. IL-2 production is impaired by C-term AKAP450-GFP overexpression and AKAP450 depletion. (A-B) J77/SEE-pulsed Raji cell conjugates of cells expressing (A) control siRNA (siNeg) or AKAP450 siRNA (siAKAP) and (B) GFP (J77-GFP) or C-term AKAP450-GFP (J77-C-term) were incubated for the times indicated, and a representative Western blot of phospho-Erk1/2 (T202/Y204) is shown. Total Erk1/2 expression was detected as loading control. One of 3 representative experiments is shown. (C-D) IL-2 release was detected by enzyme-linked immunosorbent assay in the culture supernatants of conjugates formed between SEE-pulsed Raji cells and J77 cells transfected with control or AKAP450 siRNA (C) and overexpressing GFPs or C-term AKAP450 GFPs (D). Data from control incubations with unloaded APCs (-SEE). (E-F) Relative surface expression of CD69 in conjugates formed as in panels C and D, detected by flow cytometry. Data are the arithmetic mean \pm SD of 3 independent experiments performed in triplicate. * P < .05 (Student t test).

observed for other members of the PKC family,¹⁶ or alternatively might result from the defective clustering and activation of CD3. The translocation of PKC- θ toward the IS is regulated by a PI3-K- and Vav-dependent pathway,⁴² and the diminished phosphorylation of Vav1 observed in AKAP450-disrupted cells could explain the defective recruitment of PKC- θ . In addition, AKAP450 acts as a platform for PKA signaling and harbors binding sites for protein phosphatases PP1 and PP2 and for phosphodiesterases.^{13,43} Interestingly, PKA has been described as a negative regulator of integrin adhesion strength during leukocyte chemotaxis.⁴⁴ AKAP450 might thus act at different stages of T-cell activation, initially sustaining integrin activation and MTOC translocation and later contributing to the disengagement of the IS. In addition to its role in IS formation, AKAP450 might also regulate GA function. AKAP450 is localized at the Golgi complex,^{21,35} and its role in nucleating microtubules at the cis face of the Golgi might be important for MTOC/GA translocation and function.²² The diminished release of IL-2 by AKAP450-disrupted T cells during the formation of the IS could therefore be the result of the defective MTOC/GA translocation observed in these cells.

A large number of molecules are recruited to the T lymphocyte side of the IS via the MTOC, the associated Golgi, and other organelles, such as mitochondria.^{45,46} Recruitment is directed by dynein/dynactin motor complex²⁶ and is tightly regulated by numerous signaling and adapter molecules. ZAP-70 is required for MTOC polarization toward the IS,⁴⁷ and it has recently been reported that MTOC polarization is also modulated by LAT and Fyn.^{24,45} Our study shows that AKAP450 exerts a similar effect on MTOC polarization. Moreover, suppression of AKAP450 function had a negative effect on the activation of CD3 and PKC- θ at the IS and on the activation of PLC- γ 1, Vav1, PKC- θ , and LAT, suggesting that AKAP450 is also involved in the polarization of signaling proteins essential for TCR-induced activation. Recently, it has been shown that local TCR activation promotes the accumulation of diacylglycerol at the T-cell membrane, which concomitantly drives the gathering of dynein and MTOC movement toward this position.⁴⁸ Therefore, a defect in PLC- γ 1 activation would lead to a defect in diacylglycerol production, thus preventing dynein function and MTOC translocation. The sustained activation of the T cell could then be compromised as described.²⁶ In this sense, the expression of a nonphosphorylatable mutant form of LAT has been reported to inhibit further recruitment of LAT to the IS,⁴⁵ and we previously found that LAT sustained phosphorylation is defective on impairment of MTOC translocation to the IS, although very-early phosphorylation was preserved.²⁶ In the present study, we found that MTOC delocalization in TCR-engaged AKAP450-targeted cells was accompanied by decreased LAT phosphorylation. Together, these data suggest that the effect of AKAP450 disruption on LAT-sustained activation might be the result of deficient recruitment of LAT from its intracellular pool toward the

IS,⁴⁵ as a consequence of the inhibition of translocation of the MTOC and GA. However, disruption of AKAP450 function also altered TCR/CD3 activation state at the nascent c-SMAC, supporting the role of AKAP450 in the proper formation of the SMACs. This is consistent with the diminished activation of CD3 observed in C-term AKAP450-GFP T cells, indicated by the reductions in the staining with the CD3/TCR-activation-reporter APA1/1 mAb and in the phosphorylation of CD3 ζ . Nevertheless, we have observed that TCR-mediated signaling was not abrogated completely by AKAP450 disruption, and it is conceivable that the remaining initial activation of TCR/CD3 would be sufficient to promote a partial MTOC translocation toward the IS, which could explain the small percentage of C-term-expressing or AKAP450 knockdown cells that still translocate their MTOC toward the IS.

In conclusion, our data suggest that AKAP450 is necessary for T-cell activation by regulating the conformational activation of LFA-1 and TCR/CD3 molecules at the immune synapse and MTOC translocation. The involvement of the MTOC/GA in the recruitment of intracellular pools of signaling molecules (LAT, Fyn, Pyk2^{45,49}) toward the IS seems to play an important role in the amplification of intracellular signals and in cytokine secretion by T cells.

Acknowledgments

The authors thank Dr R. Gonzalez-Amaro and S. Barlett for critical reading and editorial support of the manuscript and Drs Hortensia de la Fuente and Esteban Veiga for technical advice and generous help.

This work was supported by Ministerio de Educación y Ciencia of Spain (FPU fellowship) (J.R.-V.), postdoctorate position (N.B.M.-C.; and SAF2008-02635), Comunidad de Madrid (INSINET 0159/2006), Red RECAVA (RD06/0014-0030), and Fundación CNIC from Instituto Carlos III (Ministerio de Educación y Ciencia of Spain).

Authorship

Contribution: J.R.-V., N.B.M.-C., and F.S.-M. designed experimentation and analyzed results; J.R.-V., N.B.M.-C., and A.L. collected and analyzed the data; J.R.-V. and N.B.M.-C. made the figures; S.M. and Y.V. provided valuable reagents and performed critical reading of the manuscript; and J.R.-V. wrote the manuscript with input from N.B.M.-C. and F.S.-M.

Conflict-of-interest disclosure: The authors declare no competing financial interests.

Correspondence: Francisco Sánchez-Madrid, Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Diego de León, 62, 28006, Madrid, Spain; e-mail: fsanchez.hlpr@salud.madrid.org.

References

- Monks CR, Freiberg BA, Kupfer H, Sciaky N, Kupfer A. Three-dimensional segregation of supramolecular activation clusters in T cells. *Nature*. 1998;395(6697):82-86.
- Grakoui A, Bromley SK, Sumen C, et al. The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation. *Science*. 1999; 285(5425):221-227.
- Dustin ML, Olszowy MW, Holdorf AD, et al. A novel adaptor protein orchestrates receptor patterning and cytoskeletal polarity in T-cell contacts. *Cell*. 1998;94(5):667-677.
- Vicente-Manzanares M, Sanchez-Madrid F. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat Rev Immunol*. 2004;4(2):110-122.
- Gomez TS, Billadeau DD. T cell activation and the cytoskeleton: you can't have one without the other. *Adv Immunol*. 2008;97:1-64.
- Geiger B, Rosen D, Berke G. Spatial relationships of microtubule-organizing centers and the contact area of cytotoxic T lymphocytes and target cells. *J Cell Biol*. 1982;95(1):137-143.
- Kupfer A, Dennert G. Reorientation of the microtubule-organizing center and the Golgi apparatus in cloned cytotoxic lymphocytes triggered by binding to lysable target cells. *J Immunol*. 1984; 133(5):2762-2766.
- Kupfer A, Mosmann TR, Kupfer H. Polarized expression of cytokines in cell conjugates of helper T cells and splenic B cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(3):775-779.
- Chang JT, Palanivel VR, Kinjyo I, et al. Asymmetric T lymphocyte division in the initiation of adaptive immune responses. *Science*. 2007; 315(5819):1687-1691.
- Kodani A, Sutterlin C. The Golgi protein GM130

- regulates centrosome morphology and function. *Mol Biol Cell*. 2008;19(2):745-753.
11. Kodani A, Kristensen I, Huang L, Sutterlin C. GM130-dependent control of Cdc42 activity at the Golgi regulates centrosome organization. *Mol Biol Cell*. 2009;20(4):1192-1200.
 12. Bisel B, Wang Y, Wei JH, et al. ERK regulates Golgi and centrosome orientation towards the leading edge through GRASP65. *J Cell Biol*. 2008;182(5):837-843.
 13. Takahashi M, Shibata H, Shimakawa M, Miyamoto M, Mukai H, Ono Y. Characterization of a novel giant scaffolding protein, CG-NAP, that anchors multiple signaling enzymes to centrosome and the Golgi apparatus. *J Biol Chem*. 1999;274(24):17267-17274.
 14. Shanks RA, Steadman BT, Schmidt PH, Goldenring JR. AKAP350 at the Golgi apparatus: I. Identification of a distinct Golgi apparatus targeting motif in AKAP350. *J Biol Chem*. 2002;277(43):40967-40972.
 15. Witczak O, Skalhegg BS, Keryer G, et al. Cloning and characterization of a cDNA encoding an A-kinase anchoring protein located in the centrosome, AKAP450. *EMBO J*. 1999;18(7):1858-1868.
 16. Takahashi M, Mukai H, Oishi K, Isagawa T, Ono Y. Association of immature hypophosphorylated protein kinase cepsilon with an anchoring protein CG-NAP. *J Biol Chem*. 2000;275(44):34592-34596.
 17. Keryer G, Witczak O, Delouvee A, et al. Dissociating the centrosomal matrix protein AKAP450 from centrioles impairs centriole duplication and cell cycle progression. *Mol Biol Cell*. 2003;14(6):2436-2446.
 18. Keryer G, Di Fiore B, Celati C, et al. Part of Ran is associated with AKAP450 at the centrosome: involvement in microtubule-organizing activity. *Mol Biol Cell*. 2003;14(10):4260-4271.
 19. El Din El Homasany BS, Volkov Y, Takahashi M, et al. The scaffolding protein CG-NAP/AKAP450 is a critical integrating component of the LFA-1-induced signaling complex in migratory T cells. *J Immunol*. 2005;175(12):7811-7818.
 20. Barreiro O, de la Fuente H, Mittelbrunn M, Sanchez-Madrid F. Functional insights on the polarized redistribution of leukocyte integrins and their ligands during leukocyte migration and immune interactions. *Immunol Rev*. 2007;218:147-164.
 21. Kim HS, Takahashi M, Matsuo K, Ono Y. Recruitment of CG-NAP to the Golgi apparatus through interaction with dynein-dynactin complex. *Genes Cells*. 2007;12(3):421-434.
 22. Rivero S, Cardenas J, Bornens M, Rios RM. Microtubule nucleation at the cis-side of the Golgi apparatus requires AKAP450 and GM130. *EMBO J*. 2009;28(8):1016-1028.
 23. Lowin-Kropf B, Shapiro VS, Weiss A. Cytoskeletal polarization of T cells is regulated by an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-dependent mechanism. *J Cell Biol*. 1998;140(4):861-871.
 24. Martin-Cofreces NB, Sancho D, Fernandez E, et al. Role of Fyn in the rearrangement of tubulin cytoskeleton induced through TCR. *J Immunol*. 2006;176(7):4201-4207.
 25. Serrador JM, Cabrero JR, Sancho D, Mittelbrunn M, Urzainqui A, Sanchez-Madrid F. HDAC6 deacetylase activity links the tubulin cytoskeleton with immune synapse organization. *Immunity*. 2004;20(4):417-428.
 26. Martin-Cofreces NB, Robles-Valero J, Cabrero JR, et al. MTOC translocation modulates IS formation and controls sustained T cell signaling. *J Cell Biol*. 2008;182(5):951-962.
 27. Risueno RM, Gil D, Fernandez E, Sanchez-Madrid F, Alarcon B. Ligand-induced conformational change in the T-cell receptor associated with productive immune synapses. *Blood*. 2005;106(2):601-608.
 28. Sanchez-Madrid F, Nagy JA, Robbins E, Simon P, Springer TA. A human leukocyte differentiation antigen family with distinct alpha-subunits and a common beta-subunit: the lymphocyte function-associated antigen (LFA-1), the C3bi complement receptor (OKM1/Mac-1), and the p150,95 molecule. *J Exp Med*. 1983;158(6):1785-1803.
 29. Lu C, Shimaoka M, Zang Q, Takagi J, Springer TA. Locking in alternate conformations of the integrin alphaLbeta2 domain with disulfide bonds reveals functional relationships among integrin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(5):2393-2398.
 30. Lu C, Ferzly M, Takagi J, Springer TA. Epitope mapping of antibodies to the C-terminal region of the integrin beta 2 subunit reveals regions that become exposed upon receptor activation. *J Immunol*. 2001;166(9):5629-5637.
 31. Kanner SB, Grosmaire LS, Ledbetter JA, Damle NK. Beta 2-integrin LFA-1 signaling through phospholipase C-gamma 1 activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(15):7099-7103.
 32. Porter JC, Bracke M, Smith A, Davies D, Hogg N. Signaling through integrin LFA-1 leads to filamentous actin polymerization and remodeling, resulting in enhanced T cell adhesion. *J Immunol*. 2002;168(12):6330-6335.
 33. Rodriguez-Fernandez JL, Sanchez-Martin L, de Frutos CA, et al. LFA-1 integrin and the microtubular cytoskeleton are involved in the Ca(2+)-mediated regulation of the activity of the tyrosine kinase PYK2 in T cells. *J Leukoc Biol*. 2002;71(3):520-530.
 34. Weiss A. T cell antigen receptor signal transduction: a tale of tails and cytoplasmic protein-tyrosine kinases. *Cell*. 1993;73(2):209-212.
 35. Larocca MC, Shanks RA, Tian L, Nelson DL, Stewart DM, Goldenring JR. AKAP350 interaction with cdc42 interacting protein 4 at the Golgi apparatus. *Mol Biol Cell*. 2004;15(6):2771-2781.
 36. Herreros L, Rodriguez-Fernandez JL, Brown MC, et al. Paxillin localizes to the lymphocyte microtubule organizing center and associates with the microtubule cytoskeleton. *J Biol Chem*. 2000;275(34):26436-26440.
 37. Huse M, Lillemeyer BF, Kuhns MS, Chen DS, Davis MM. T cells use two directionally distinct pathways for cytokine secretion. *Nat Immunol*. 2006;7(3):247-255.
 38. Bauman AL, Scott JD. Kinase- and phosphatase-anchoring proteins: harnessing the dynamic duo. *Nat Cell Biol*. 2002;4(8):E203-E206.
 39. Williams RO. Cutting edge: A-kinase anchor proteins are involved in maintaining resting T cells in an inactive state. *J Immunol*. 2002;168(11):5392-5396.
 40. Kuhn JR, Poenie M. Dynamic polarization of the microtubule cytoskeleton during CTL-mediated killing. *Immunity*. 2002;16(1):111-121.
 41. Mittelbrunn M, Molina A, Escribese MM, et al. VLA-4 integrin concentrates at the peripheral supramolecular activation complex of the immune synapse and drives T helper 1 responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(30):11058-11063.
 42. Villalba M, Bi K, Hu J, et al. Translocation of PKC-[theta] in T cells is mediated by a nonconventional, PI3-K- and Vav-dependent pathway, but does not absolutely require phospholipase C. *J Cell Biol*. 2002;157(2):253-263.
 43. Sillibourne JE, Milne DM, Takahashi M, Ono Y, Meek DW. Centrosomal anchoring of the protein kinase CK1delta mediated by attachment to the large, coiled-coil scaffolding protein CG-NAP/AKAP450. *J Mol Biol*. 2002;322(4):785-797.
 44. Laudanna C, Campbell JJ, Butcher EC. Elevation of intracellular cAMP inhibits RhoA activation and integrin-dependent leukocyte adhesion induced by chemoattractants. *J Biol Chem*. 1997;272(39):24141-24144.
 45. Bonello G, Blanchard N, Montoya MC, et al. Dynamic recruitment of the adaptor protein LAT: LAT exists in two distinct intracellular pools and controls its own recruitment. *J Cell Sci*. 2004;117(7):1009-1016.
 46. Sanchez-Madrid F, Serrador JM. Mitochondrial redistribution: adding new players to the chemotaxis game. *Trends Immunol*. 2007;28(5):193-196.
 47. Blanchard N, Di Bartolo V, Hivroz C. In the immune synapse, ZAP-70 controls T cell polarization and recruitment of signaling proteins but not formation of the synaptic pattern. *Immunity*. 2002;17(4):389-399.
 48. Quann EJ, Merino E, Furuta T, Huse M. Localized diacylglycerol drives the polarization of the microtubule-organizing center in T cells. *Nat Immunol*. 2009;10(6):627-635.
 49. Sancho D, Montoya MC, Monjas A, et al. TCR engagement induces proline-rich tyrosine kinase-2 (Pyk2) translocation to the T cell-APC interface independently of Pyk2 activity and in an immunoreceptor tyrosine-based activation motif-mediated fashion. *J Immunol*. 2002;169(1):292-300.